

LightCycler®

LightCycler® Nano System ユーザートレーニングガイド, バージョン 1.0

ソフトウェアバージョン 1.0

2011年6月



本製品は研究用です。

診断目的に利用することはできません。

For life science research only.

Not for use in diagnostic procedures.

プロローグ	5
I 改訂履歴	5
II お問い合わせ	5
III 商標	6
IV 用途	6
V 序文	6
VI ライセンスの免責事項	6
VII 本ガイドに用いられる規則	6
VIII 警告および予防措置	9
A システムの起動	11
1 LightCycler® Nano Instrument の起動	11
2 LightCycler® Nano Software の起動	12
B 主なアプリケーション	15
1 PCR のダイナミックレンジを明らかにする絶対定量	16
1.1 サンプルのセットアップ	16
1.2 実験のプログラミングと実行	18
1.2.1 実験の作成	18
1.2.2 光学系の設定	19
1.2.3 プロファイルの作成	20
1.2.4 サンプルとターゲットの編集	23
1.2.5 実験の実行	28
1.3 解析方法の設定	30
1.4 結果の解析	33
2 同一ラン内の標準曲線と T_m Calling を用いた絶対定量	35
2.1 サンプルのセットアップ	35
2.2 実験のプログラミングと実行	37
2.2.1 光学系の設定	37
2.2.2 プロファイルの作成	38
2.2.3 サンプルとターゲットの編集	39
2.2.4 実験の実行	42
2.3 自動定量 (Automatic Quantification)	43
2.3.1 解析方法の設定	43
2.3.2 結果の解析	45
2.4 Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	48
2.4.1 解析方法の設定	48
2.4.2 結果の解析	51
2.5 T_m Calling	53
2.5.1 解析方法の設定	53
2.5.2 結果の解析	55
3 ターゲット 2 種類とリファレンス 2 種類を用いたキャリブレーションを含む相対定量	57
3.1 サンプルのセットアップ	57
3.2 実験のプログラミングと実行	59
3.2.1 光学系の設定	59
3.2.2 プロファイルの作成	60
3.2.3 サンプルとターゲットの編集	61
3.2.4 実験の実行	64
3.3 解析方法の設定	65
3.4 結果の解析	67

4	High Resolution Melting	69
4.1	サンプルのセットアップ	69
4.2	実験のプログラミングと実行	71
4.2.1	光学系の設定	71
4.2.2	プロファイルの作成	72
4.2.3	サンプルとターゲットの編集	73
4.2.4	実験の実行	76
4.3	解析方法の設定	77
4.4	結果の解析	81
5	エンドポイントジェノタイピング	85
5.1	サンプルのセットアップ	85
5.2	実験のプログラミングと実行	87
5.2.1	光学系の設定	87
5.2.2	プロファイルの作成	88
5.2.3	サンプルとターゲットの編集	89
5.2.4	実験の実行	92
5.3	解析方法の設定	93
5.4	結果の解析	95
C	システムのシャットダウン	97
D	別表	99
1	インデックス	99

プロローグ

I 改訂履歴

ユーザートレーニングガイドのバージョン	ソフトウェアのバージョン	改訂日	変更
V1.0	V1.0	2011年6月	第1版

© Copyright 2011, Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.

本文書の情報は通知なしに変更されることがあります。本文書のいかなる部分もロシュ・ダイアグノスティックスの明示的な書面での許可なしに、いかなる目的でも、電子的または機械的なあらゆる形態またはあらゆる手段で複製または転送してはなりません。

本ユーザートレーニングガイドの内容に関する質問やコメントはロシュ・ダイアグノスティックスにお問い合わせください。

LightCycler® Nano Systemユーザートレーニングガイドに含まれる情報は正確であるように最善の努力をしています。

ただし、Roche Diagnostics GmbHは現在進行中の製品開発の一環として必要な変更を予告なしに行う権利を保有しています。

II お問い合わせ



製造

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

日本での販売

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部（研究用試薬・機器）
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
TEL: 03-5443-5287

III 商標

LIGHTCYCLER、MAGNA PURE、RESOLIGHT、FASTSTARTはロシュの商標です。

ProbeLibraryおよびLNAはデンマークVedbaekのExiqon A/Sの登録商標です。

SYBRは米国オレゴン州ユージーンのMolecular Probes, Inc.の商標です。

VICは米国のApplied Biosystems Corporationまたは他の国におけるその子会社の商標です。

その他のブランドまたは製品名はそれぞれの所有者の商標です。

IV 用途

LightCycler® Nano InstrumentはDNA結合蛍光色素または標識プローブのリアルタイムオンライン検出と組み合わせることで迅速かつ正確なPCRを行うことにより、ターゲット核酸の定量または特性の解析を実施します。

LightCycle® Nano Systemはライフサイエンス研究での使用を意図しています。本機器の取扱説明書を熟読し、研究の技術的なトレーニングを受けた方のみご使用いただけます。LightCycler® Nano Instrumentを診断に用いることはできません。

LightCycler® Nano Systemは屋内での使用のみを意図しています。

V 序文

LightCycler® Nano Instrumentの操作設定の前に、ユーザー向け文書を熟読することが重要です。指示の不履行または文書に記載されていない操作により、安全上の問題が生じることがあります。

VI ライセンスの免責事項

ライセンスの免責事項に関する情報は、変更または修正されます。特定の製品に対するライセンスの免責事項に関する現在の情報については、オンライン・テクニカル・サポートのページ (<http://technical-support.roche.com>) を参照してください。

VII 本ガイドに用いられる規則

文書規則

本ガイドでは、情報を一貫した形で提示し、読みやすくするために、以下の文書規則を使用しています。

番号付けした一覧	一覧にした順序で実施する手順の段階
イタリック体	LightCycler® Nano Softwareの操作案内に用いられます。また、重要な注意事項や参考情報はイタリック体で示されます。
青いイタリック体	本ユーザートレーニングガイド内の参照すべき別の節を示します。
[]	角カッコはキーボードのキーを示します。
<>	カギカッコは適切な値に置き換えるべき変数を示します。

略語

本ガイドでは以下の略語が使用されています。

略語	意味
Cq	定量サイクル(Quantification Cycle)
Cy5	Cyanine 5
E	効率(Efficiency)
EPF	エンドポイント蛍光(Endpoint Fluorescence)
FAM	6-Carboxy Fluorescence
GOI	ターゲット遺伝子(Gene of Interest)
HEX	Carboxy-2',4,4',5',7,7'-Hexachlorofluorescein
HRM	High Resolution Melting (高解像度融解)
LAN	ローカル・エリア・ネットワーク
LED	発光ダイオード(Light Emitting Diode)
MWP	マルチウェルプレート
NTC	No Template Control
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	保護接地アース(Protection Earth)
qPCR	リアルタイム定量PCR
RFU	Relative Fluorescence Unit
SD	標準偏差(Standard Deviation)
SNP	一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism)
SYBR	SYBR Green I(二本鎖結合色素)
T _m	融解温度
UPL	Universal ProbeLibrary
VIC	加水分解プローブ用レポーター色素

本ガイドで使用する記号

記号	意味	説明
	警告	重要な操作およびメンテナンス上の指示が装置付属の文献中にあることを警告します。機器内部にユーザーが点検可能なパーツはありません。
	HOT SURFACE (表面が高温)	機器表面が高温となる可能性を表示します。
	バイオハザード	感染の可能性がある材料を用いて作業する際に特定の予防措置を講じなければならないことを示します。
	レーザー放射	LightCycler® Nano InstrumentにはLEDおよびレーザー光源が含まれることを示します。
	重要な注意事項	本製品の正しい操作手順または使用のための重要な情報。
	参考情報	記載されているトピックまたは操作手順に関する追加情報。
		手順が次ページに続く
		手順の終了

機器上に使用する記号

記号	意味	説明
	機器の製造業者	Roche Diagnostics GmbH Mannheim Germany Made in EU
	CE MARK	機器のベースプレートにあるCE MARKは、本機器が関連する基本要件に適合していることを示します。
	HOT SURFACE (表面が高温)	機器蓋内部に添付。
	レーザー放射	機器ベースプレート上に添付。
	警告	機器ベースプレート上に添付。
	WEEE廃棄記号	機器ベースプレート上に添付。本記号のマークされている機器は欧州議会および理事会の廃電気・電子製品 (WEEE) に関する法規の対象であることを示します。 ヨーロッパでは本機を自治体の廃棄システムに従って廃棄するべきでないことを示します。

これらの記号に加えて、機器ベースプレート上に以下の情報を示しています。

- ▶ 型: LightCycler® Nano
- ▶ 16進法および一次元バーコードによる機器シリアル番号
- ▶ 24VDC 6.25A
- ▶ 16進法および二次元バーコードによるユニット番号

VIII 警告および予防措置



緊急時には、装置の電源を直ちに抜いてください。

LightCycler® Nano Instrumentは取扱説明書を熟読した方のみご使用になれます。

LightCycler® Nano Instrumentの据付および操作に必要な下記の安全性情報を熟読し、遵守することが重要です。LightCycler® Nano Instrumentで作業する全作業員がすべての安全性情報にアクセスできるようにしてください。

取扱上の要件



LightCycler® Nano Instrumentは電気機械的機器です。本マニュアルに記載の指示に従って使用しない場合、ユーザーが身体的損傷を受ける可能性があります。

- ▶ 本分析機器上に印字あるいは添付されているすべての安全指示に従ってください。
- ▶ 電気機器に適用される一般的な安全予防措置を遵守してください。
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentが主電源に接続されている間は電気部品にアクセスしないでください。
- ▶ 濡れた手で電源ケーブルに触れないでください。
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentの筐体を開けないでください。
- ▶ 電源ケーブルを接続したまま装置の清掃をしないでください。
- ▶ 許可を受けたサービス担当者のみが、機器の点検または修理を実施できます。
- ▶ ネットワークケーブルを屋外で使用しないでください。



- ▶ 毒性、腐食性、感染の可能性がある物質を取り扱う際は、必ず安全ゴーグルおよび手袋を着用してください。



- ▶ 高度に精製した核酸を用いて作業しますが、安全のために、生物学的材料はすべて感染の可能性があるものとみなしてください。感染の可能性がある物質の取り扱いおよび廃棄は現地の安全性ガイドラインに従って実施します。飛沫は直ちに適切な消毒液で消毒し、実験室作業員または機器が汚染されないようにしてください。
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentのクリーニングに関する指示は「LightCycler® Nano Instrument オペレーターズガイド」の「クリーニングとお手入れ」の章をご覧ください。



機器をコンセントに接続している場合蓋が高温になることがあります。

一般的な使用上の注意



LightCycler® Nano Systemにはネットワークに接続できるソフトウェアが含まれています。しかしネットワークへの接続により製品に有害な影響が生じうることをご承知おきください。例えば、悪質なコード(ウイルス、トロイの木馬など)による感染またはハッカーの侵入など未許可の第三者によるアクセスが挙げられます。このためロシュでは、適切かつ最新の措置を講じることでそうしたリスクから本製品を保護することを強く推奨します。本製品は適切なファイアウォールなしにネットワーク内で使用することを意図しておらず、そうした使用向けにデザインされていないため、ロシュではこの点について賠償責任を負いません。



本機器の不適切な設置により結果が不正確になったり、機器がダメージを受けたりする可能性があります。据付マニュアルに慎重に従ってください。



火花による爆発の危険。可燃性または爆発性物質(例、麻酔ガス)を機器に近づけないでください。電気部品に液体を噴霧するとショートし、火災が発生する可能性があります。本機器を主電源に接続中はカバーを閉じておき、LightCycler® Nano Instrumentの近くでスプレーを用いないでください。消火活動中はLightCycler® Nano Instrumentと主電源の接続を切ってください。



機器を分解しないでください。ユーザーが点検可能な部品はありません。

電気的な安全性



LightCycler® Nano Instrumentは保護等級I(IEC)に従ってデザインされています。ACアダプタは保護アース(PE)にケーブルで接続されています。感電の危険に対する保護のため、本機器は115/230 V電線用三線式接地コンセントなどの認可された電源に直接接続してください。非接地コンセントしか利用できない場合、資格を有する電気技師が現地の電気コードに従って適切に接地した(PE)コンセントに交換してください。延長コードは使用できません。

電気の接地経路が遮断した場合、機器の内側または外側のいずれも危険な状態となる可能性があります。いかなる状況においても、オペレーターは本機器の安全特性を変更または故意に無効にしようとはなりません。電源ケーブルに亀裂、摩耗、切断、その他の損傷が発生した場合、ロシュ・ダイアグノスティックスから同等の部品を調達して直ちに交換してください。



相互作用および推奨されていない機能に関する警告に注意してください。誤使用の可能性も念頭に置いて、起こりうる結果に注意することを推奨します。

システムの起動

ランの準備をする前に、機器とソフトウェアを起動させてください。

1 LightCycler® Nano Instrumentの起動

LightCycler® Nano Instrumentは、電源コードをコンセントに挿すだけで起動します。機器の各 부품の詳細に関しては「LightCycler® Nano Instrumentオペレータズガイド」の「システムの説明」の項をご参照ください。

LightCycler® Nano Instrumentの起動

- 1 LightCycler® Nano Instrumentをコンセントに繋ぎます。
パワーオン・セルフテスト (POST) の間、ヒートリッドのステータスカラーは青です。機器がロードできる状態になると緑に変わります。



2 LightCycler® Nano Softwareの起動

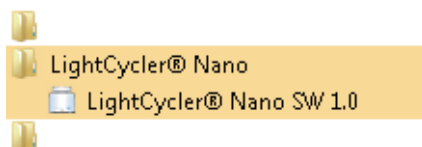
ソフトウェアを起動させる前に、コンピュータにインストールしてください。インストールの詳細については「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「システムの説明」の項をご参照ください。

Microsoft Windows 7で LightCycler® Nano Softwareを起動させる

- 1 コンピュータのスイッチをオンにします。
- 2 下記のいずれかを行います:
 - ▶ デスクトップ上のショートカットファイルをダブルクリックします。



- ▶ Start メニューの LightCycler® Nano フォルダから LightCycler® Nano SW 1.0 をクリックします。



- ▶ ファイルブラウザの中で、インストールディレクトリを探し、Nano.exe ファイルをダブルクリックします。

LightCycler® Nano Softwareの起動中は起動画面が表示され、その後メインウィンドウが開きます。

Mac OS X 10.6でLightCycler® Nano Softwareを起動させる

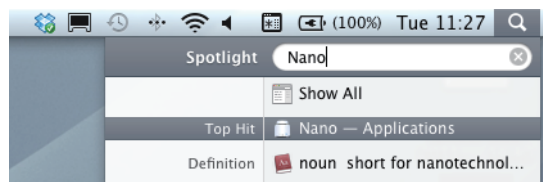
- 1 コンピュータのスイッチをオンにします。
- 2 下記のいずれかを行います:
 - ▶ Finderを使用して Applications フォルダから Nano アプリケーションをダブルクリックします。



- ▶ アプリケーションをdockにドラッグしてある場合、dockにあるアイコンをクリックします。



- ▶ Spotlight フィールドに nano と打ち込み、アプリケーションを検索します。リストの中の Nano - Applications をクリックしアプリケーションを起動させます。



LightCycler® Nano Softwareのメインウィンドウが開き、dockの中に Nano アイコンが表示されます。



主なアプリケーション

本章では下記の例を使ってLightCycler® Nano Systemを使う実験の実施方法を説明します:

- ▶ PCRのダイナミックレンジを明らかにする絶対定量: 16ページ。
- ▶ 同一ラン内の標準曲線と T_m Callingを用いた絶対定量: 35ページ。
- ▶ ターゲット 2種類とリファレンス 2種類を用いたキャリブレーターを含む相対定量: 57ページ。
- ▶ High Resolution Melting: 69ページ。
- ▶ エンドポイントジェノタイピング: 85ページ。

すべての実験は32本のチューブ; LightCycler® 8-Tube Strips (clear)をストリップ4本を使用します。

各アプリケーションについて下記の手順を記載します:

- ▶ 核酸サンプルの準備方法
- ▶ PCRのプログラムとランの方法
- ▶ 解析法の設定方法
- ▶ 結果の解析方法

すべてのランに必要な条件

ランは下記の条件が整った場合に限り実行できます:

- ▶ 機器が起動している: 11ページのLightCycler® Nano Instrumentの起動の節をご参照ください。
- ▶ コンピュータが機器に接続されている。
- ▶ コンピュータとソフトウェアが起動している: 12ページのLightCycler® Nano Softwareの起動をご参照ください。



LightCycler® Nano Softwareとグラフィカルユーザーインターフェースの全要素の詳細については、[LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド]の「ソフトウェア」の章をご参照ください。

B

1 PCRのダイナミックレンジを明らかにする絶対定量

絶対定量により、1つまたは複数のターゲットを定量し、最終結果を絶対的な数値（コピー／mlなど）として表現することができます。量とコピー数の絶対値は、既知の量／コピー数のターゲット特異的なスタンダードの希釈液を使用して取得します。

ここでは、FAMラベルの加水分解プローブを用いて 1×10^9 から 1×10^0 コピーまでの10倍希釈系列（それぞれ3重測定）のセットアップと実行方法について説明します。標準曲線は、ダイナミックレンジと解析の検出限界を明らかにするための最適なツールです。ダイナミックレンジを決定するために、1つの典型的な陽性サンプルを可能な限り最大濃度から解析の検出限界まで1:10で段階希釈していきます。4～6桁の濃度範囲の動的範囲があれば、質の良い解析です。LightCycler® Nano Instrumentでは、9桁を超える濃度範囲でテンプレート濃度を正確にモニタリングすることができ、ウイルス量やプラスミドのコピー数を検出するのに最適です。

サンプル	プラスミドDNA、 1×10^9 コピー/μl
試薬	▶ FastStart Essential DNA Probes Master (2×濃度) ▶ Forwardプライマー: 最終濃度200 nM ▶ Reverseプライマー: 最終濃度200 nM、アンプリコン70 bp ▶ UPL Probe#137: 反応液中の最終濃度200 nM

1.1 サンプルのセットアップ

サンプルをセットアップするにあたって、まず20 μlのPCRミックスを32反応分と、サンプル希釈液を準備します:



セットアップの間、反応チューブは氷上に置き、サンプルとPCRミックスを冷却し続けてください。

PCRミックス

試薬	μl/反応
H ₂ O	3
FastStart Essential DNA Probes Master (2×濃度)	10
Forwardプライマー (5 μM)	0.8
Reverseプライマー (5 μM)	0.8
UPL #137 (10 μM)	0.4
PCRミックス(上記の混合液)	15
サンプル	5
反応液	20

サンプルの希釈

プラスミドDNAを 1×10^9 から 1×10^0 コピーまでの10段階希釈系列で希釈します。

ピペッティングスキーム

- 1

PCRミックス15 μ lを、LightCycler® 8-Tube Strips (clear)の各チューブへと分注します。
- 2

下記の図の通り、各希釈液5 μ lを各チューブへ分注します。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	1E9	1E9	1E9	1E8	1E8	1E8	1E7	1E7
Strip B	1E7	1E6	1E6	1E6	1E5	1E5	1E5	1E4
Strip C	1E4	1E4	1E3	1E3	1E3	1E2	1E2	1E2
Strip D	1E1	1E1	1E1	1E0	1E0	1E0	H ₂ O	H ₂ O

遠心

- 1

ストリップのキャップを正しい位置にしっかりと押し付け、チューブを閉じます。

 完全に閉じられていることを確認してください。完全に閉じていなければランの間に中身が蒸発する恐れがあります。
- 2

安全に遠心するために、チューブストリップを標準の96穴マルチプルウェルプレート（MWP）に設置します。



- 3

MWPに入れたチューブを3,000 x gで最長30秒間遠心します。



1.2 実験のプログラミングと実行

実験のプログラミングでは下記のことを行います:

- ▶ ラン設定の指定
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentで実施するPCRサイクルの設定
- ▶ サンプルとターゲット情報の入力

1.2.1 実験の作成

- 1 メインウィンドウの experiment bar の *New* をクリックします。
LightCycler® Nano Softwareのメインウィンドウには新規の実験が表示されます。新規の実験にはデフォルトの実験名 *New Experiment* と作成された日付と時間が表示されます。

Open Experiments:

Unsaved (New Experiment 2011-05-31 12:...

New

Open

Save

- 2 オプション: *Experiment Summary* において、デフォルトの実験名を変更します:
 - ▶ *Name* のフィールドで現在表示されている文字を削除します。
 - ▶ 新しい名前を入力します。
 - ▶ キーボードの<Enter>キーを押します。

- 3 オプション: *Notes* のエリアに実験に関する備考を入力します。

Open Experiments: Unsaved (Dynamic_Range_HP) New Open Save Save As...

Experiment Run Settings Profile Data Samples Analysis

Experiment Summary

Name: Dynamic_Range_HP

Instrument Type: LightCycler Nano

Instrument Id:

Experiment Created: 2011-05-31 12:03

Run State: Not Started

Run Start Time:

Run Completion Time:

Settings: Intercalating Dye, Normal Quality

Profile:

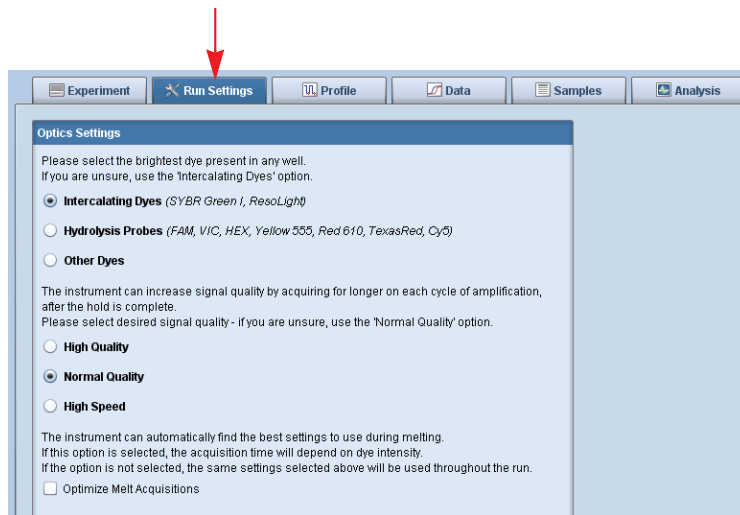
Analyses: No analyses

Notes:

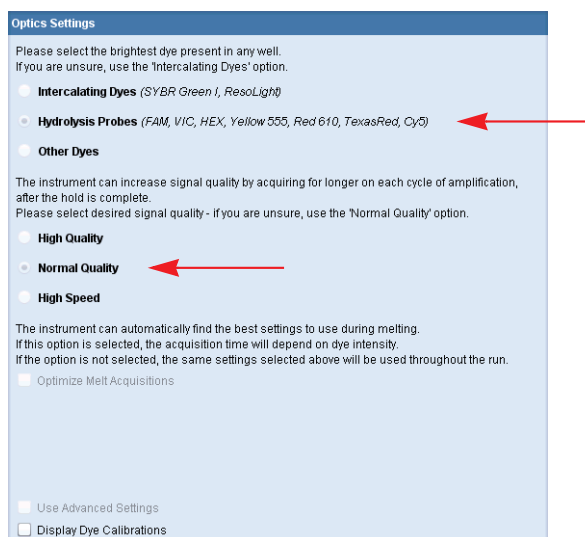
10-fold dilution series from 1E9 to 1E0 copies with FAM-labeled hydrolysis probes

1.2.2 光学系の設定

- 1 *Run Settings* タブを開きます。*Optics Settings* ウィンドウがデフォルトで表示されます。



- 2 この実験ではFAM色素を使用するため、最初の選択グループでは、*Hydrolysis Probes* (加水分解プローブ) を選択します (25ページの [ターゲットの編集と割り当て](#) の節をご参照ください)。
- 3 次の選択グループでは *Normal Quality* (標準品質) を選択して光学系の取得品質を設定します。



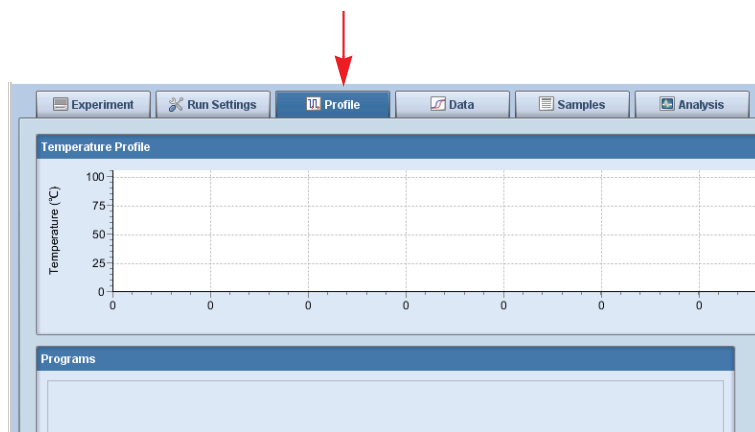
1.2.3 プロファイルの作成

この例では、下記の加熱と冷却のサイクルを使います:

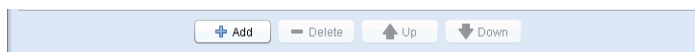
Program		Temp (°C)	Ramp (°C/s)	Hold (s)
Hold		95	4	600
2-Step Amplification	45 Cycles	95	5	20
		60	4	40

対応するプロファイルの設定

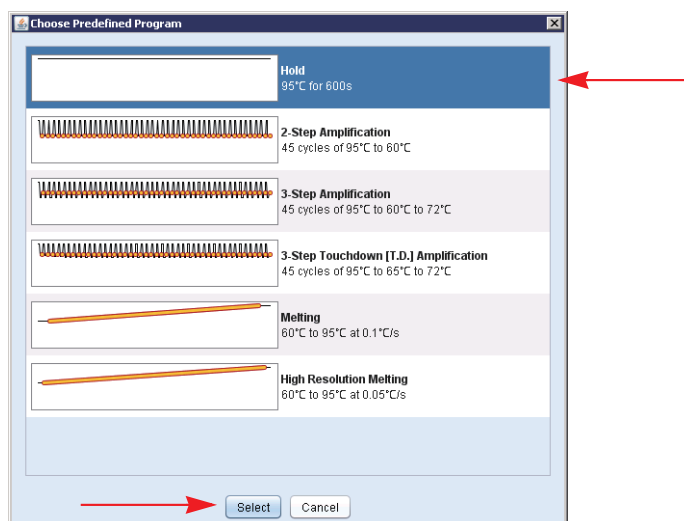
- 1 Profileタブを開きます。



- 2 Programsウィンドウで、Addをクリックし Choose Predefined Programs リストを開きます。



- 3 最初のフェーズの Hold (初期変性) プログラムを選択し Select (選択) をクリックします。



プログラムが Programs (プログラム) リストに追加され、Temperature Profile (温度プロファイル) にこのフェーズが表示されます。



4 Hold ウィンドウにおいてプログラムパラメータのデフォルト値を修正します:

- ▶ Name: プログラムの名前
- ▶ Temp (°C): 95
- ▶ Ramp (°C/秒): 4
- ▶ Hold(s): 600

5 2-Step Amplification プログラムを追加し、Cyclingウィンドウのパラメータの値を修正します。

- ▶ Name: プログラムの名前
- ▶ No. of Cycles: 45

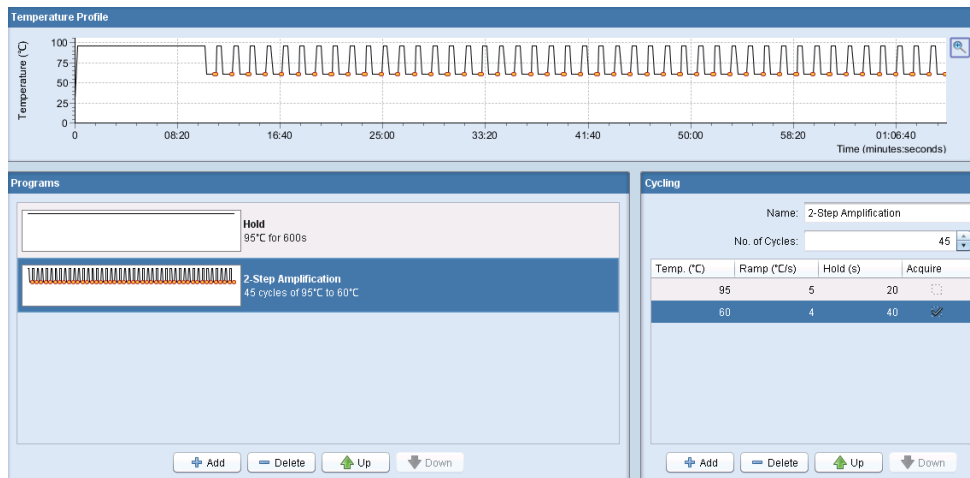
Column	Value Step 1	Value Step 2
Temp. (°C)	95	60
Ramp (°C/s)	5	4
Hold (s)	20	40
Acquire		Yes



ランの最後に別々の冷却プログラムを追加する必要はありません。各ランの終了時にサンプルは自動的に+40 °C に冷却されます。



- 6 *Temperature Profile* に表示されるグラフで作成した実験プロトコル全体を確認します。このグラフを用いて時間と温度サイクルを確認し、必要に応じてプログラムと温度設定を修正します。

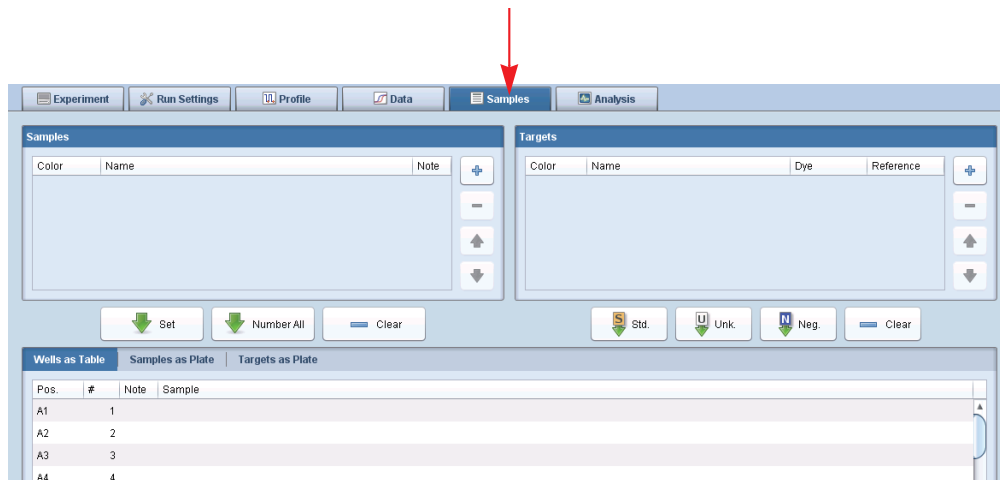


1.2.4 サンプルとターゲットの編集

実験ごとに、各ウェルのサンプル、ターゲット、ターゲットを標識するために用いる色素を設定します。設定したサンプルとターゲットのデータは、解析を行う際に使用します。実験のピペッティングスキームについては、17ページの「[ピペッティングスキーム](#)」の項をご参照ください。

サンプルの編集と割り当て

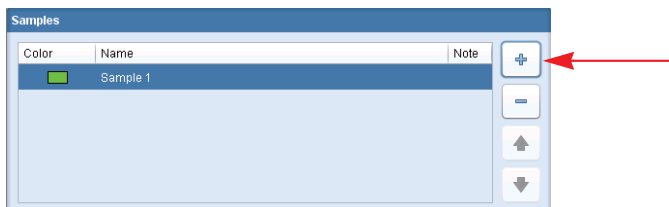
- 1 *Samples* タブを開きます。



- 2 *Samples* ウィンドウにおいて、 をクリックして新しいサンプルを追加します。

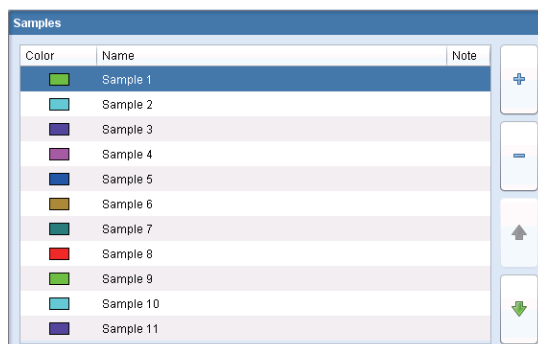


ボタンを複数回クリックすることで、「Sample1」から「Sample<n>」までの名前でサンプルを必要な数だけ追加できます。



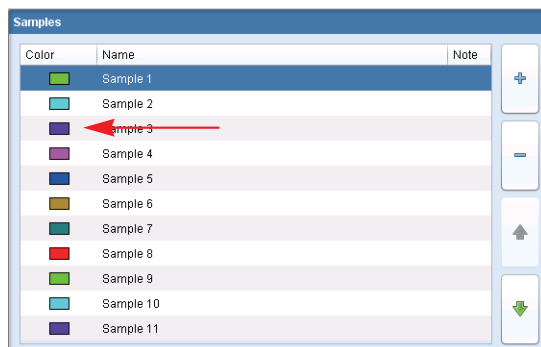
- 3 ステップ2を繰り返して、各希釈濃度に従って11サンプルを追加します（16ページの「[サンプルの希釈](#)」の項をご参照ください）。

新しいサンプルはデフォルトの色とデフォルトの *Sample1* から *Sample11* までの名前で追加されます。

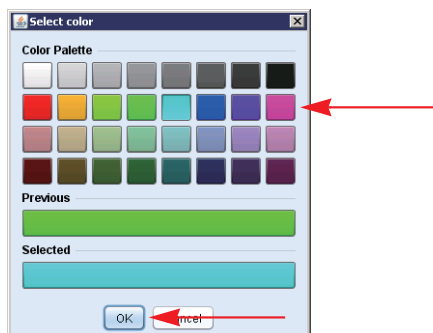


4 オプション: サンプルの色を変更します:

- ▶ *Color* の欄にある四角い色付きボックスをダブルクリックし、サンプルに異なる色を割り当てます。



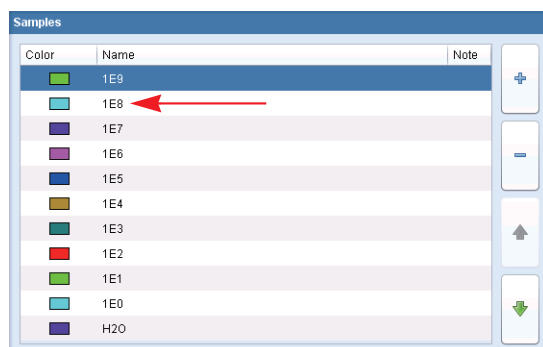
- ▶ *Select color* ダイアログボックスにおいて、使いたい色を選択し *OK* をクリックします。ダイアログボックスは閉じられ、リストにあるサンプルの色が変更されます。



5 オプション: サンプル名を変更します:

- ▶ サンプル名をダブルクリックします。
- ▶ サンプル名を変更します。

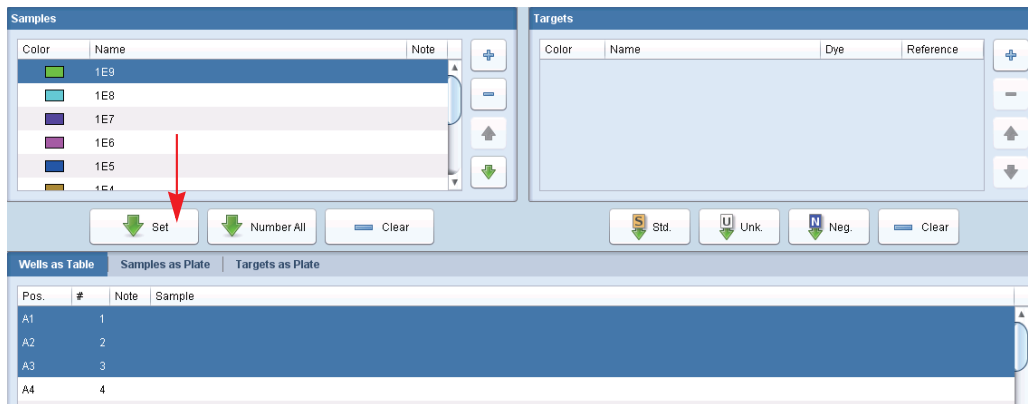
この例では、サンプル名は希釈濃度に基づいて選択されています(16ページの「[サンプルの希釈](#)」をご参照ください)。

6 オプション: *Notes* の欄に各サンプルに関する備考を入力します。

7 サンプル 1E9 を選択します。

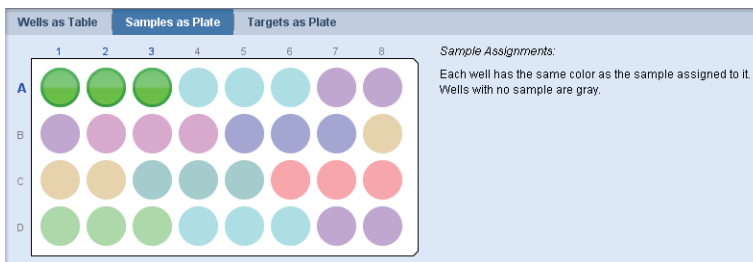
8 *Wells as Table* タブまたは *Samples as Plate* タブにおいて、A1、A2、A3 のウェルを選択します。

- 9 Set をクリックしてウェルにサンプルを追加します。



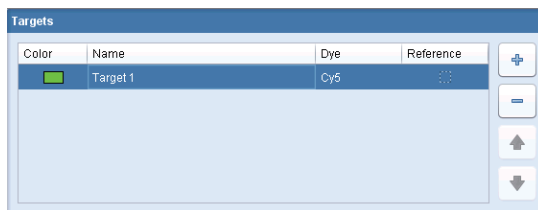
この操作により、対応するサンプルを表中の選択した各ウェルに割り当てます。また、同じ操作により、選択したウェルに既に割り付けられているサンプルを変更することも可能です。

- 10 ステップ7～9を繰り返して、すべてのサンプルを対応するウェルに割り当てます。
 こうして *Wells as Table* と *Samples as Plate* タブには、割り当てられたサンプルが表示されます：



ターゲットの編集と割り当て

- 1 *Targets* ウィンドウで(画像) をクリックし、新しいターゲットを追加します。ターゲットはデフォルトの名前である *target1* とデフォルトの色素 *Cy5* とともに追加されます。
 ボタンを複数回クリックすることで、「Target 1」から「Target tx」までの名前のターゲットを適切な数だけ追加できます。

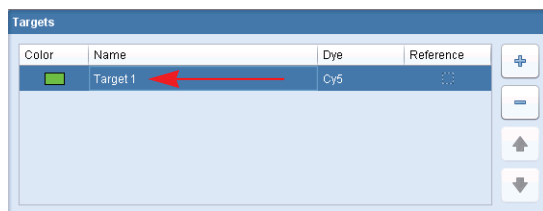


- 2 オプション: ターゲットの色を変更します。
 ▶ *Color* の欄にある四角い色付きボックスをダブルクリックし、ターゲットに異なる色を割り当てます。Select color ダイアログボックスが開きます。
 ▶ 使いたい色を選択し OK をクリックします。ダイアログボックスは閉じられ、リストにあるターゲットの色は変更されます。



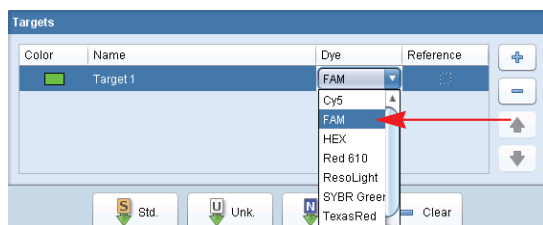
3 オプション: ターゲットの名前を変更します。

- ▶ ターゲットの名前をダブルクリックします。
- ▶ ターゲットの名前を変更します。



4 ターゲットに色素を割り当てます:

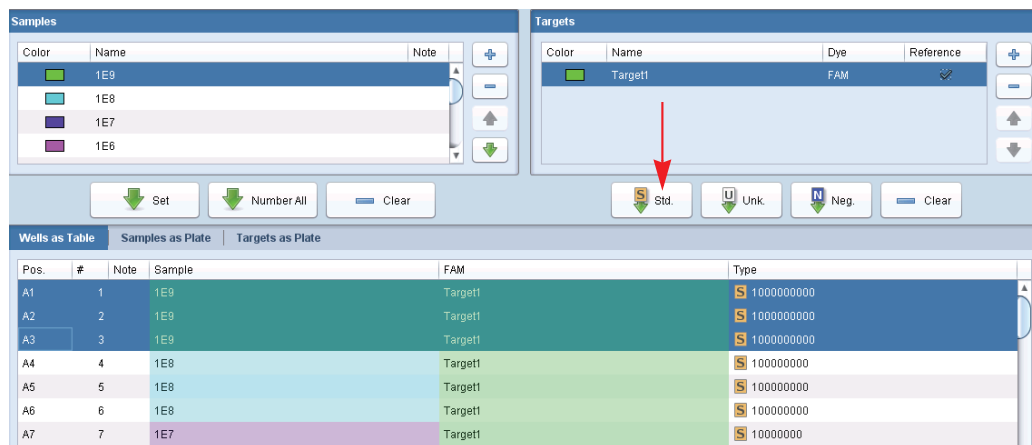
- ▶ Dyeの欄をクリックします。表示されているリストは現在使用可能なすべての色素です。
- ▶ ここではFAMを使用します。



5 ターゲットを選択します。

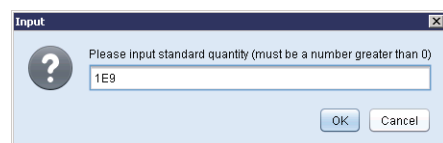
6 Wells as Table タブまたは Targets as Plate タブにおいて、最も量が多いターゲットが割り当てられるA1〜A3ウェルを選択します。

7 Stdをクリックし、そのターゲットを1つのスタンダード量として選択したウェルに追加します。



8 Input ダイアログボックスが開き、スタンダード量の値を入力するよう求められます。該当する量を入力します。

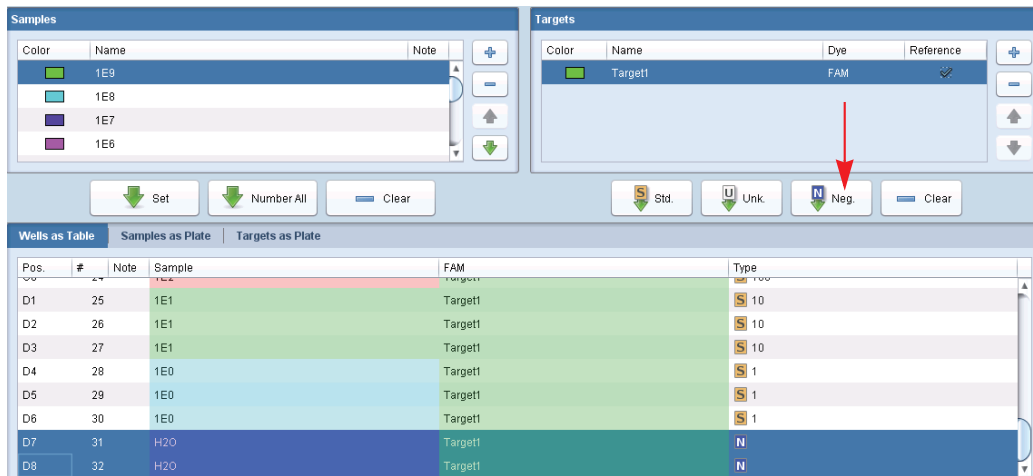
 量が「1,000,000,000」である場合「1E9」または「1000000000」の値のいずれかを入力します。どちらの表記でも正しく認識されます。



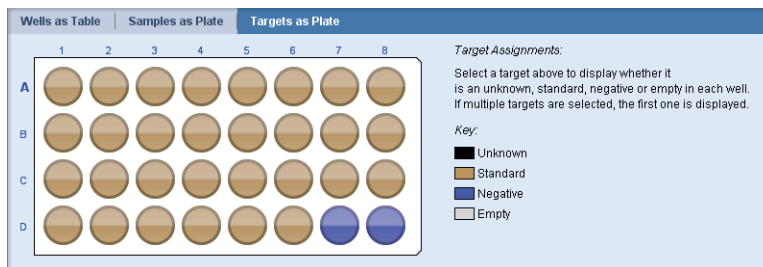
9 ステップ5〜8を繰り返し、各量のターゲットをA4〜D6のウェルに割り当てます。



- 10 ウェルD7とD8を選択し *Neg.* をクリックし、選択したウェルにNegativeとしてターゲットに追加します。

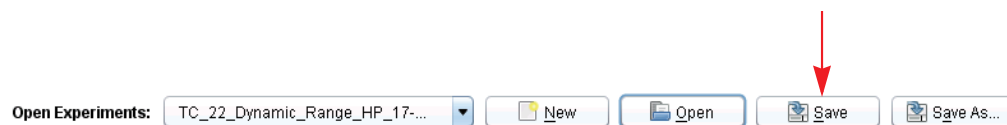


- 11 こうして *Wells as Table* タブと *Targets as Plate* は、対応するウェルに割り当てられたターゲットが表示されます。

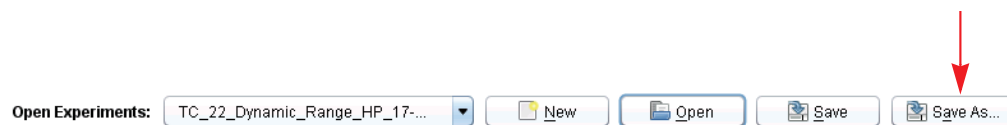


実験の保存

- 1 メインウィンドウの experiment bar において:
 ▶ *Save* をクリックし、現在開いている実験を保存します。ファイルがない場合は、*Save* ダイアログボックスが開きます。



- ▶ *Save As* をクリックし、実験を特定の場所に保存します。*Save As* ダイアログボックスが開きます。



すべての保存オプションに関する詳細は、「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。

1.2.5 実験の実行

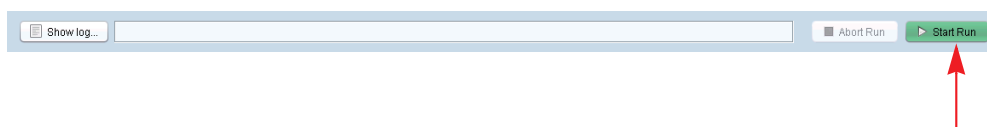
セットアップパラメータ (光学系の設定、温度プロファイル、サンプル、ターゲット) を設定し、設定を保存すると、LightCycler® Nanoの実験を実行する準備が整います。

ランの開始

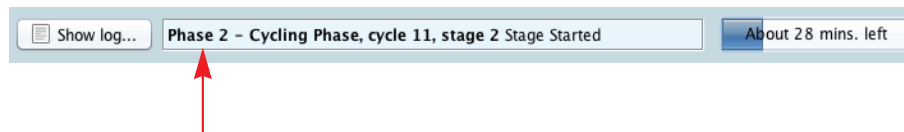
- 1 LightCycler® Nano Instrumentにサンプルのチューブストリップを設置します。



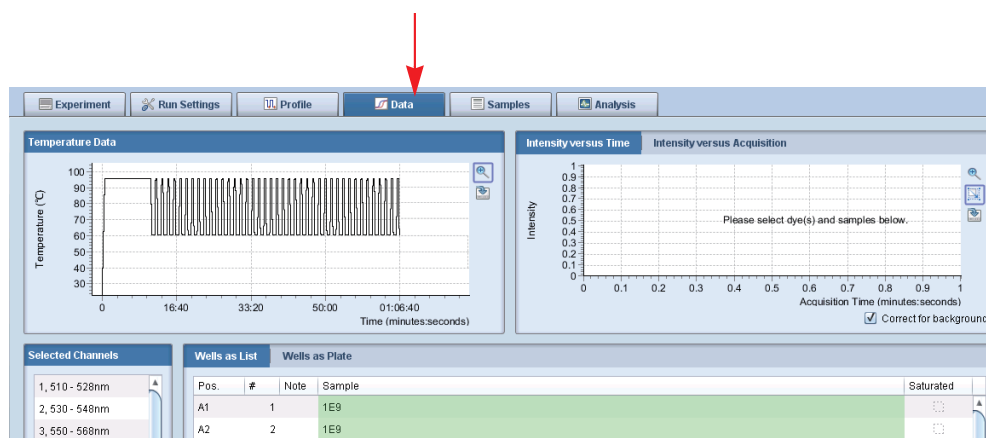
- 2 ステータスバーの Start Run をクリックします。必要な場合、実験を保存するよう求められます。



ステータスバーには現在のランの状況が表示されます。



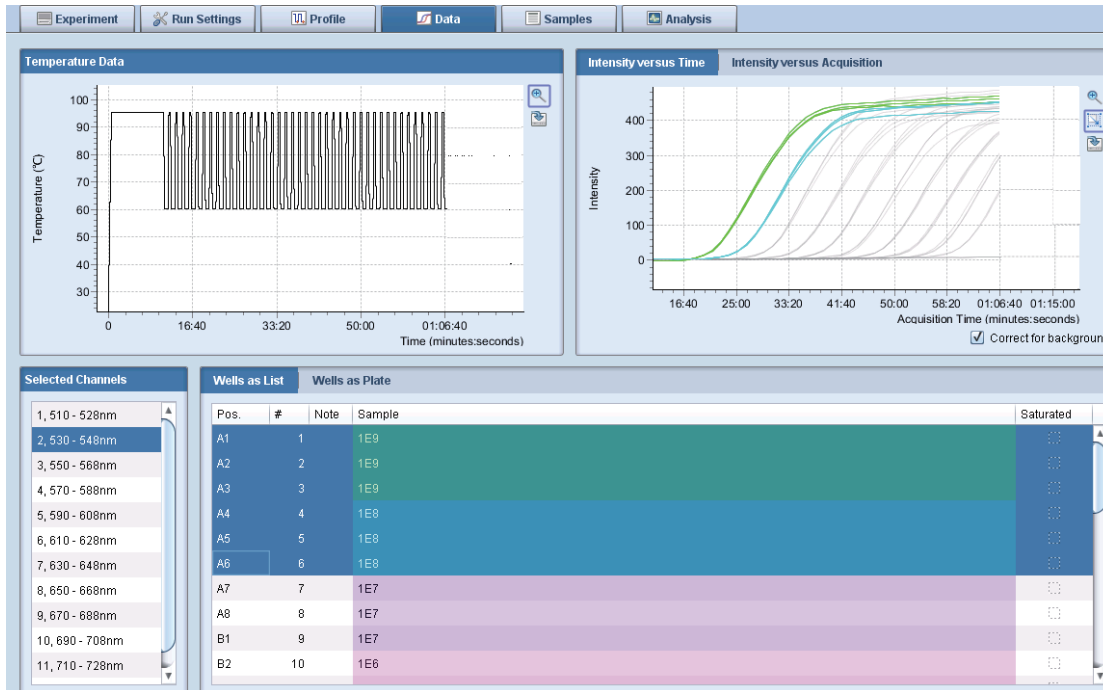
- 3 Dataタブを開き、実行中の実験の進行状況を確認します。



ランのモニタリング



Dataタブのグラフと表の詳細については、「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。



- 1 FAM色素を使用している場合、Selected Channels (チャンネルの選択) ウィンドウで530 - 548 nmを選択します。
- 2 Wells as List (リストで見るウェル) タブまたは Wells as Plate (プレートで見るウェル) タブを使って、グラフのウィンドウに表示させるウェルを選択します。
- 3 グラフのウィンドウにおいて:
 - ▶ 表示させるサンプルを選択します。
 - ▶ Correct for background (バックグラウンド補正) オプションにチェックを入れます。
 - ▶ 曲線のツールチップを表示させ、情報を表示させます。

ランの間、LightCycler® Nano Instrumentのヒートリッドの色は、ランの進行に応じた温度とデータ取得状況に基づき変化します。それぞれの色の意味については、「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「システムの説明」の章をご参照ください。

ランの終了

ランの終了は下記によって確認できます。

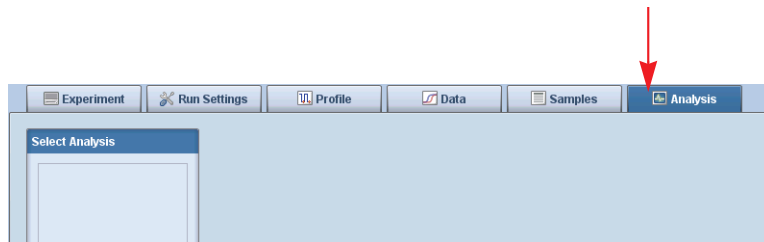
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentのヒートリッドが開きます。ヒートリッドの色が青緑に変化します。
- ▶ メインウィンドウのステータスバーに Complete と表示されます。
- ▶ Data タブに最終生データが表示されます。

1.3 解析方法の設定

算出結果を表示させるために、解析タイプを設定します。この希釈系列においては、自動定量 (Automatic Quantification) による絶対定量解析が最適なオプションです。

自動定量法 (Automatic Quantification method) の設定

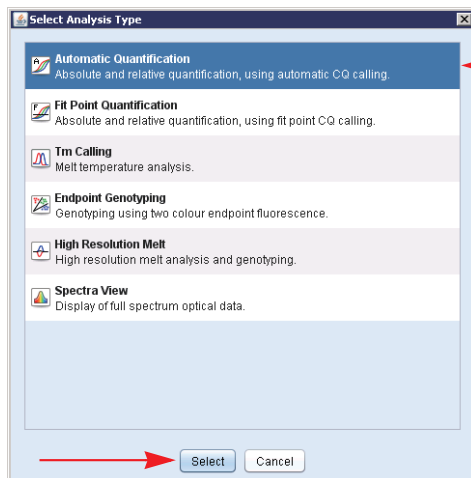
- 1 Analysis タブを開きます。



- 2 Select Analysis ウィンドウにおいて、(画像)  をクリックし新しい解析を追加します。Select Analysis Typeダイアログが開きます。



3 Automatic Quantificationを選択し、Selectをクリックします。

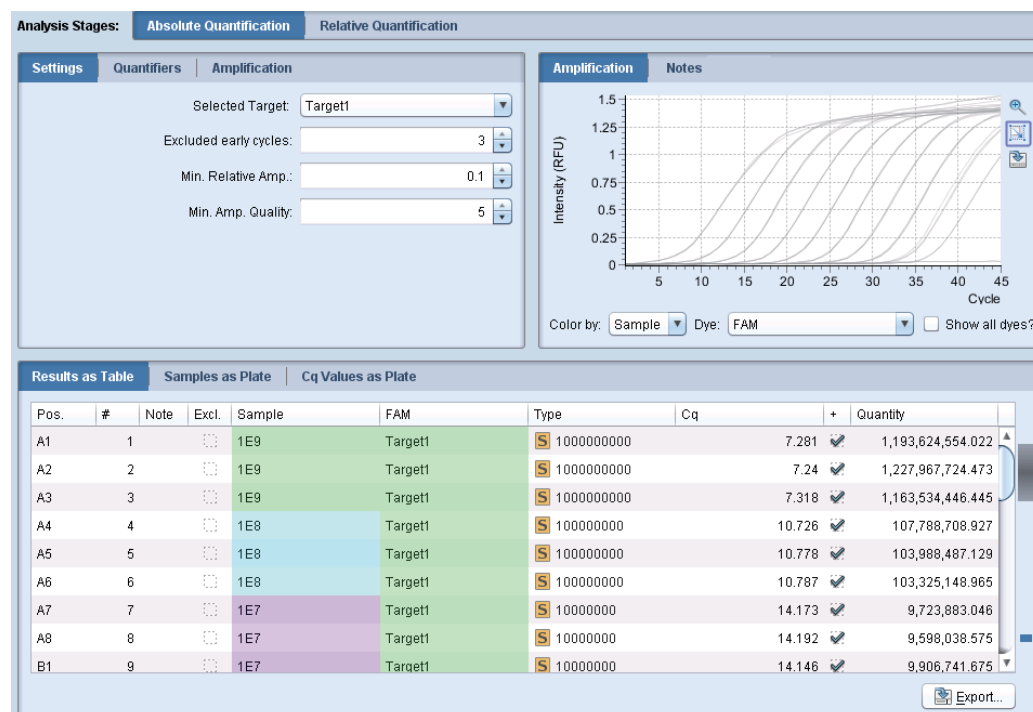


Absolute Quantificationタブが表示され、SettingsとAmplificationタブにデフォルト値が表示されます。

Results as Tableタブには、Samplesタブにおける設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。

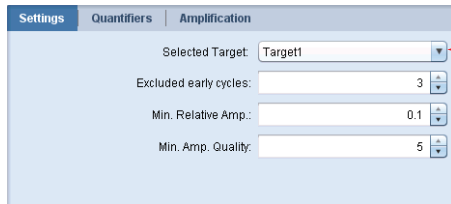


新しい解析を追加したり設定を変更したりする際は、「Select Analysis」ウィンドウの該当する解析に計算の進行状況が表示されます。結果を解析するには、そこが「Complete」と表示されるまで待ちます。

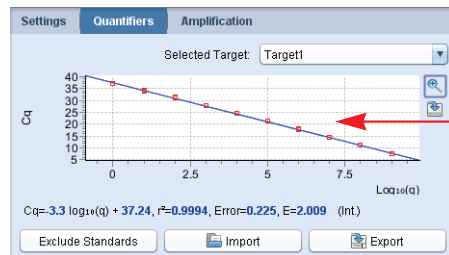


4 Settings タブにおいて:

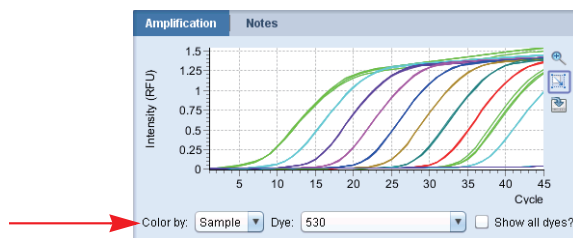
- ▶ 解析するターゲットを選択します。
- ▶ その他の設定において、この例ではデフォルト値を使います。



5 Quantifiers タブは、算出された標準曲線を表示し、増幅の品質を評価します。効率 (E) 値は2が理想的な増幅であり、1サイクルで2倍に増幅されていることを示します。

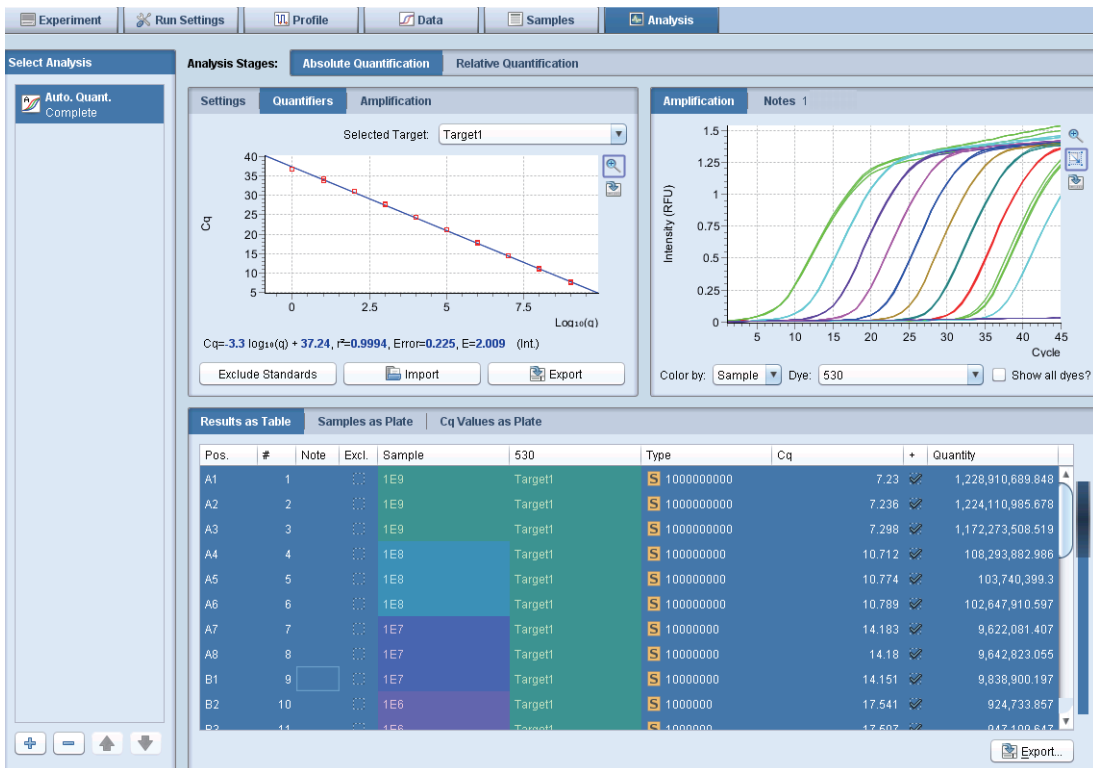


6 Amplification タブでは、曲線の色分けについて、sample 毎、または Cq values 毎を選択します。

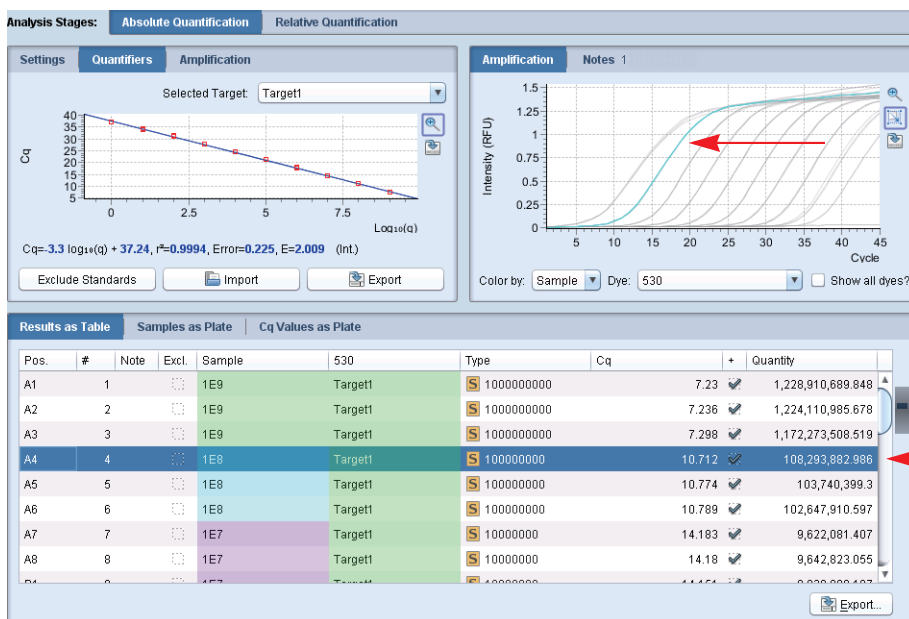


1.4 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、Analysisタブにより結果を確認します。



- 1 表示させるサンプルを選択します。Amplificationタブにおいて選択されている曲線は、常にresultsウィンドウで選択しているサンプルに対応しています。



キーボードの[Ctrl]と[a]キーを使って「Results as Table」タブのすべてのサンプルを選択します。

- 2 resultsウィンドウでは、見たいデータによって、Results as Table (表で見る結果)タブ、Samples as Plate (プレートで見るサンプル)タブ、または Cq Values as Plate (プレートで見るCq値)タブを開きます。

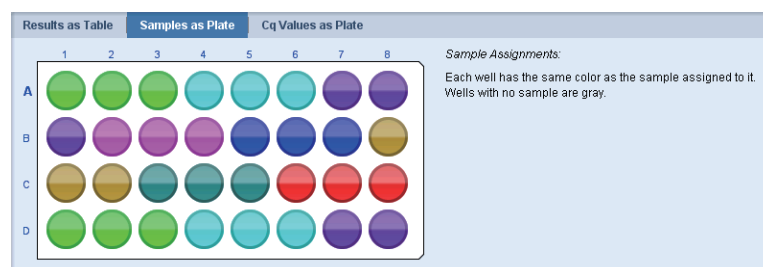
Results as Table

結果では期待されるダイナミックレンジが示されています。すべての希釈系列は全範囲にわたってポジティブです。LightCycler® Nano Systemは希釈系列 1×10^9 から 1×10^0 コピーまで検出可能です。

Results as Table										
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	530	Type	Cq	+	Quantity	
A1	1			1E9	Target1	S 1000000000	7.23		1,228,910,689.848	
A2	2			1E9	Target1	S 1000000000	7.236		1,224,110,985.678	
A3	3			1E9	Target1	S 1000000000	7.298		1,172,273,508.519	
A4	4			1E8	Target1	S 1000000000	10.712		108,293,882.986	
A5	5			1E8	Target1	S 1000000000	10.774		103,740,399.3	
A6	6			1E8	Target1	S 1000000000	10.789		102,647,910.597	
A7	7			1E7	Target1	S 100000000	14.183		9,622,081.407	
A8	8			1E7	Target1	S 100000000	14.18		9,642,823.055	
B1	9			1E7	Target1	S 10000000	14.151		9,838,900.197	
B2	10			1E6	Target1	S 1000000	17.541		924,733.857	
B3	11			1E6	Target1	S 100000	17.507		947,109.647	

Samples as Plate

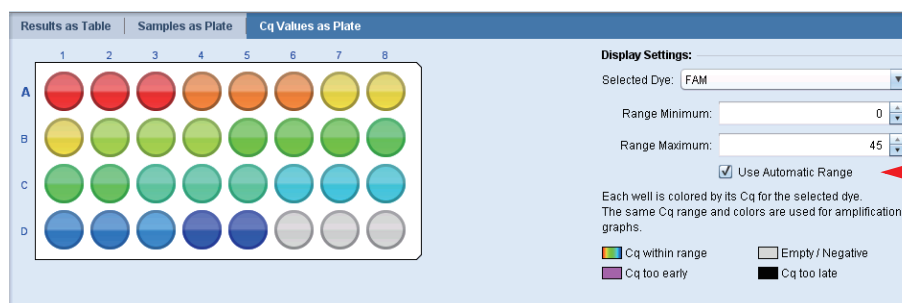
Samples as Plate (プレートで見るサンプル) タブは、実際の機器のレイアウトと一致するウェルのサンプル情報を表示します。



Cq Values as Plate

Cq Values as Plate (プレートで見るCq値) タブは、測定されたCq値のヒートマップを表示します。

- 表示設定を指定するには、*Display Settings* の該当するパラメータを修正します。
この例では、*Use Automatic Range* を選択し、自動的な範囲で色の割り付けをさせています。



2 同一ラン内の標準曲線と T_m Callingを用いた絶対定量

未知のターゲット量の絶対的な値を得る最も簡単な方法は、未知のサンプルのCqを既知のコピー数のスタンダードのCqと比較する方法です。スタンダードサンプルの材料は、様々な由来のものから選択できます（例、ターゲット配列のクローンを持つリニアプラスミドDNA、精製PCR産物）。スタンダードのターゲット量は既知量としてください。スタンダードの希釈系列、つまり異なる量のターゲットを1つのPCR反応で増幅させます。

各希釈液の既知のテンプレート量を、測定されたCq値に対してプロットします。その回帰直線は標準曲線と呼ばれ、Cq値とテンプレート量の相関を示します。テンプレート量が未知のサンプルのCq値を標準曲線と比較することで、各サンプルのテンプレート初期量を明らかにすることができます。

この例では、2種類のターゲットについて、2つの標準曲線（ $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4$ コピー）で未知のサンプル2種類を定量する際のセットアップと実施方法について説明します。各サンプルは2重測定します。

さらに定量結果を検証するために T_m Calling解析を行います。

サンプル	▶ スタンダードサンプル: ターゲット特異的プラスミドDNA (200 ng/μl)、3 pgは1コピーに相当する ▶ 未知のサンプル: ヒトゲノムDNA (未知の濃度)
試薬	▶ FastStart Essential DNA Green Master (2$\times$濃度) ▶ Target1 (ターゲット1用): Forward / Reverseプライマー 各5 μM ▶ Target2 (ターゲット2用): Forward / Reverseプライマー 各5 μM

2.1 サンプルのセットアップ

サンプルをセットアップするにあたって、まず2種類のPCRミックス（ターゲット1用とターゲット2用）をそれぞれ20 μ lを反応14回分と、サンプル希釈液を準備します。



セットアップの間、反応チューブは氷上に置き、サンプルとPCRミックスを冷却し続けてください。

PCRミックス

試薬	μ l/反応
H ₂ O	1
FastStart Essential DNA Green Master (2 $\times$ 濃度)	10
Forwardプライマー (5 μ M)	2
Reverseプライマー (5 μ M)	2
PCRミックス(上記の混合液)	15
サンプル	5
反応液	20

サンプルの希釈

スタンダードサンプルを $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^1$ コピーの希釈系列で希釈します。

ピペッティングスキーム

- 1 下記の図の通り、Target1を含むPCRミックス15 μ lとTarget2を含むPCRミックス15 μ lをLightCycler® 8-Tube Strips (clear)の各チューブへと分注します。



	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	
Strip B	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	
Strip C	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	
Strip D	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	

- 2 下記の図の通り、各サンプル希釈液5 μ lをチューブへと分注します。



ウェルには特定濃度のStandard (スタンダードサンプル) (コピー/5 μ l)、またはunknown (未知のサンプル) が含まれます。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	NTC	Standard 1×10^{-1}	Standard 1×10^{-2}	Standard 1×10^{-3}	Standard 1×10^{-4}	Unknown A	Unknown B	
Strip B	NTC	Standard 1×10^{-1}	Standard 1×10^{-2}	Standard 1×10^{-3}	Standard 1×10^{-4}	Unknown A	Unknown B	
Strip C	NTC	Standard 1×10^{-1}	Standard 1×10^{-2}	Standard 1×10^{-3}	Standard 1×10^{-4}	Unknown A	Unknown B	
Strip D	NTC	Standard 1×10^{-1}	Standard 1×10^{-2}	Standard 1×10^{-3}	Standard 1×10^{-4}	Unknown A	Unknown B	

遠心

- 1 ストリップのキャップを正しい位置にしっかりと押し付け、チューブを閉じます。
-  完全に閉じられていることを確認してください。完全に閉じていなければランの間に中身が蒸発する恐れがあります。
- 2 安全に遠心するために、チューブストリップを標準の96穴MWPIに設置します(17ページの「遠心」の項をご参照ください)。
- 3 MWPIに入れたチューブを3,000 x gで最長30秒間遠心します。



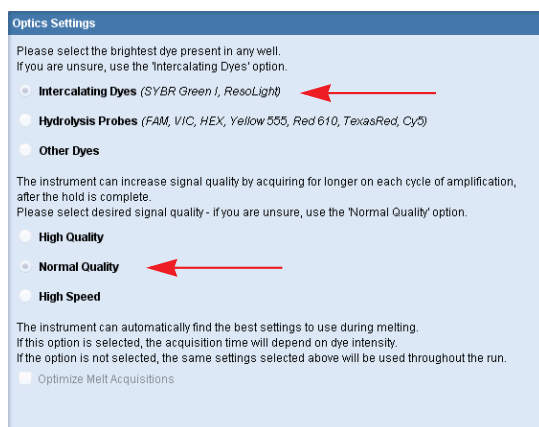
2.2 実験のプログラミングと実行



実験のセットアップと実行の方法の詳細については、18ページの「[実験のプログラミングと実行](#)」の項をご参照ください。

2.2.1 光学系の設定

- 1 新規の実験を作成します (18ページの「[実験の作成](#)」の項をご参照ください)。
- 2 *Run Settings* タブを開きます。
- 3 *Optics Settings* ウィンドウエリアにおいて:
 - ▶ この実験ではSYBR Green I色素を使用するため、*Intercalating Dyes* (インターカレーティング色素)を選択します (40ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
 - ▶ *Normal Quality* オプションを選択して光学系の取得品質を設定します。



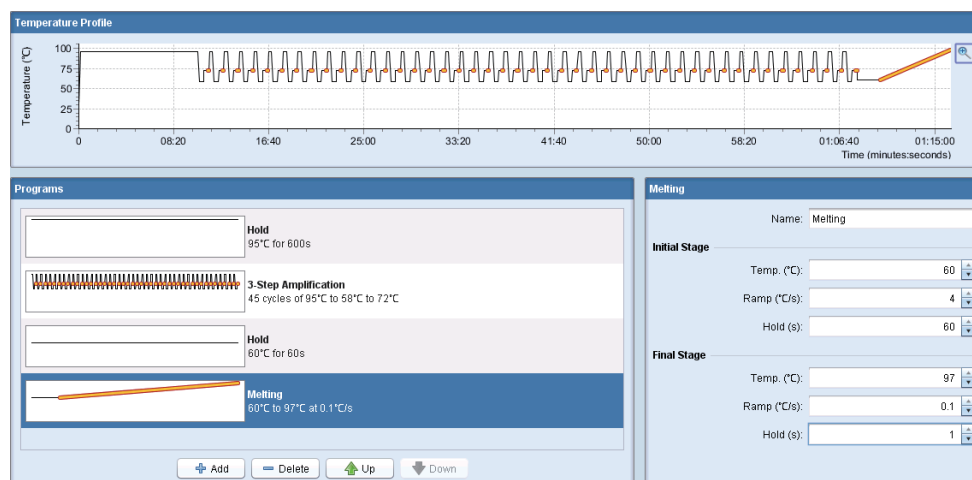
2.2.2 プロファイルの作成

この例では、下記の加熱と冷却のサイクルを使います:

Program		Temp (°C)	Ramp (°C/s)	Hold (s)	
Hold		95	4	600	
3-Step Amplification	45 Cycles	95	5	15	
		58	4	20	
		72	4	20	Acquire
Hold		95	5	10	
Melting	Initial Stage	60	4	60	
	Final Stage	97	0.1	1	

対応するプロファイルの設定

- 1 Profile タブを開きます。
- 2 Programs ウィンドウにおいて、プログラムを追加し、上表のリストの通りプログラムを設定します (20 ページの「[プロファイルの作成](#)」をご参照ください)。
- 3 Temperature Profile に設定した実験プロトコル全体をグラフで確認します。グラフで時間と温度サイクルを確認し、必要に応じてプログラムと設定温度を修正します。



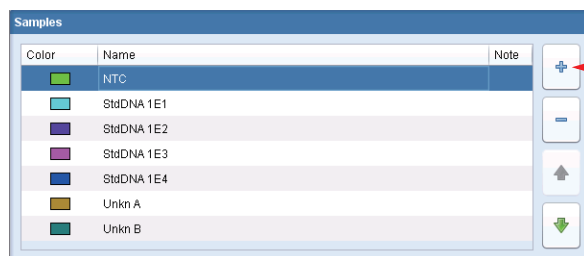
2.2.3 サンプルとターゲットの編集

サンプルの編集と割り当て

1 *Samples* タブを開きます。

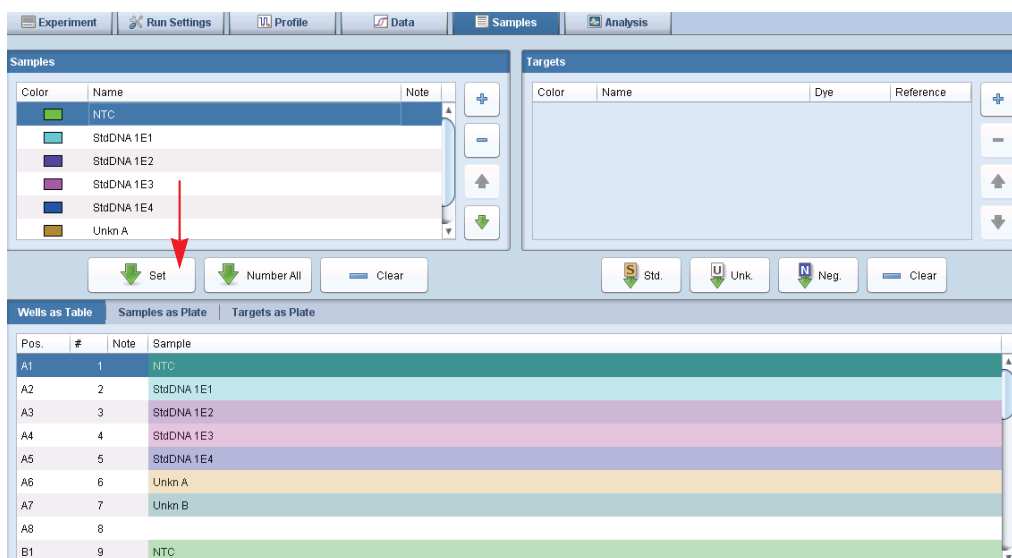
2 *Samples* ウィンドウにおいて (画像)  をクリックし、解析したいものに基づき7サンプル追加します (23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。この例では、下記のサンプル名に変更します:

- ▶ ネガティブコントロールには *NTC* (No Template Control)。
- ▶ スタンダード用の各希釈濃度のプラスミドDNAサンプルには、希釈濃度に応じてそれぞれ *StdDNA 1E1*、*1E2*、*1E3*、*1E4*。
- ▶ 未知のサンプルには *Unkn A* と *Unkn B*。

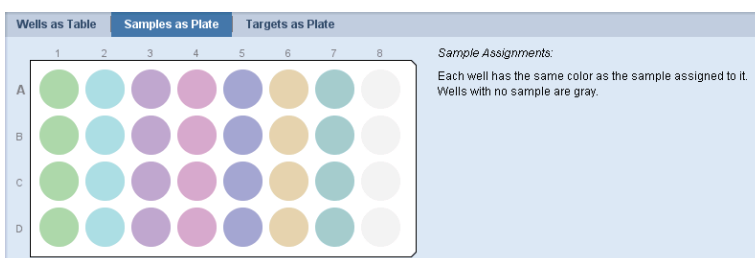


3 サンプルをウェルに割り当てます (23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」をご参照ください):

- ▶ *NTC* サンプルを選択します。
- ▶ *Wells as Table* タブまたは *Samples as Plate* タブにおいて、下記のウェルを選択します:
A1、B1、C1、D1。
- ▶ *Set* をクリックします。



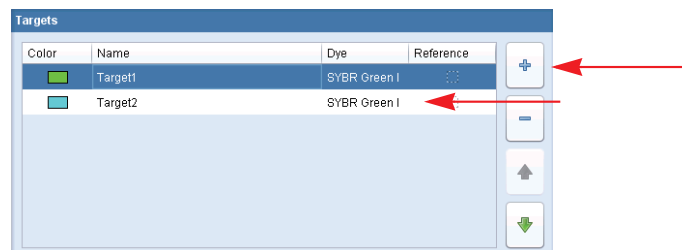
4 36ページの「[ピペッティングスキーム](#)」に従い、他のサンプルに対しても上記のステップを繰り返します。こうして *Wells as Table* と *Samples as Plate* タブには、割り当てられたサンプルが表示されます:



ターゲットの編集と割り当て

- 1 **Targets** ウィンドウで (画像)  をクリックし、2つの新しいターゲットを追加します (25ページの「ターゲットの編集と割り当て」の項をご参照ください)。

- ▶ ターゲット名を変更します。
- ▶ ターゲットに SYBR Green I 色素を割り当てます。



- 2 ネガティブコントロールを割り当てます:

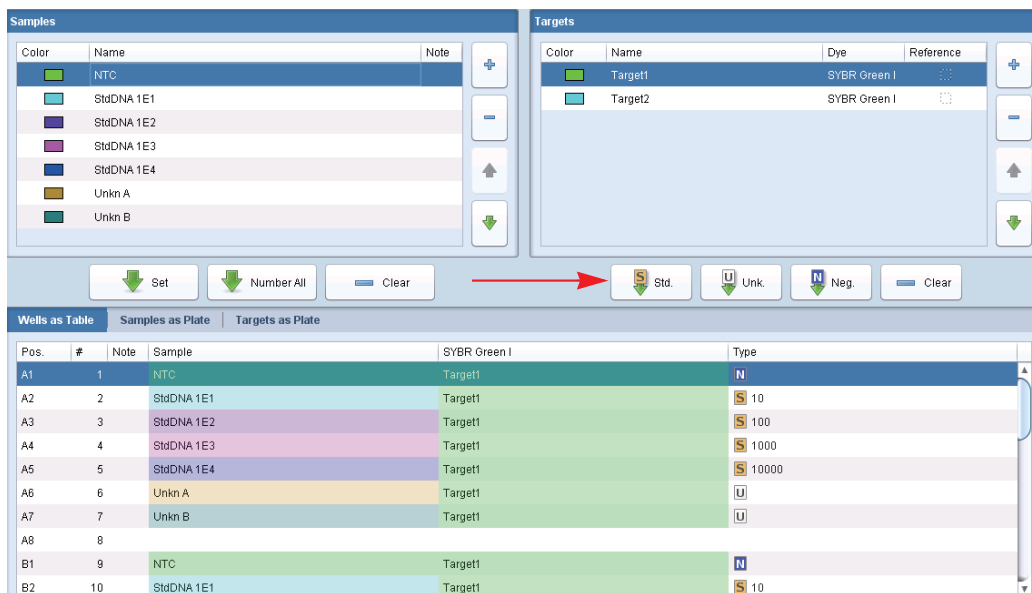
- ▶ *Target1* (ターゲット1) を選択します。
- ▶ ウェル A1 と B1 を選択します。
- ▶ *Neg.* をクリックし、そのターゲットをネガティブコントロールとして選択したウェルに追加します。

- 3 スタンダード希釈液を割り当てます:

- ▶ *Target1* を選択します。
- ▶ 希釈濃度 1×10^1 のスタンダードを含むウェル A2 と B2 を選択します。
- ▶ *Std.* をクリックし、そのターゲットを1つのスタンダード量として選択したウェルに追加します。
- ▶ *Input* ダイアログボックスでは、スタンダード量として 10 を入力します。
- ▶ 他の希釈濃度のスタンダードに対しても上記ステップを繰り返します。

- 4 未知量のターゲットをウェルに割り当てます:

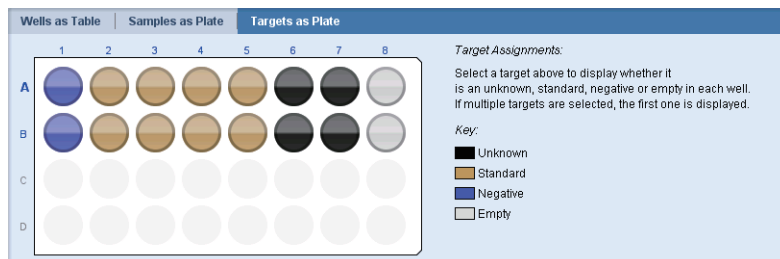
- ▶ *Target1* を選択します。
- ▶ *Wells as Table* タブまたは *Targets as Plate* タブにおいて、下記のウェルを選択します:
A6 と B6
A7 と B7
- ▶ *Unk.* をクリックし、そのターゲットを未知量として選択したウェルに追加します。



Pos.	#	Note	Sample	SYBR Green I	Type
A1	1	NTC		Target1	N
A2	2	StdDNA 1E1		Target1	S 10
A3	3	StdDNA 1E2		Target1	S 100
A4	4	StdDNA 1E3		Target1	S 1000
A5	5	StdDNA 1E4		Target1	S 10000
A6	6	Unkn A		Target1	U
A7	7	Unkn B		Target1	U
A8	8				
B1	9	NTC		Target1	N
B2	10	StdDNA 1E1		Target1	S 10



- 5 36ページの「ピペッティングスキーム」に従い、ステップ2と4を繰り返し、*Target2* (ターゲット2)をウェルに割り当てます。こうして *Wells as Table* タブと *Targets as Plate* タブには、対応するウェルに割り当てられたターゲットが表示されます:



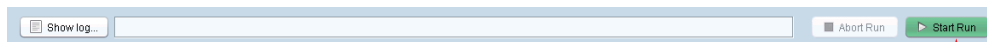
実験の保存

- 1 メインウィンドウの experiment bar において:
- ▶ *Save* をクリックし、現在開いている実験を保存します。まだファイルがなければ、*Save* ダイアログボックスが開きます。
 - ▶ *Save As* をクリックし、実験を特定の場所に保存します。*Save As* ダイアログボックスが開きます。(27ページの「[実験の保存](#)」の項をご参照ください)。

2.2.4 実験の実行

- 1 LightCycler® Nano Instrumentにサンプルのチューブストリップを設置します (28ページの「**実験の実行**」の項をご参照ください)。

- 2 ステータスバーの **Start Run** をクリックします。必要な場合、実験を保存するよう促されます。

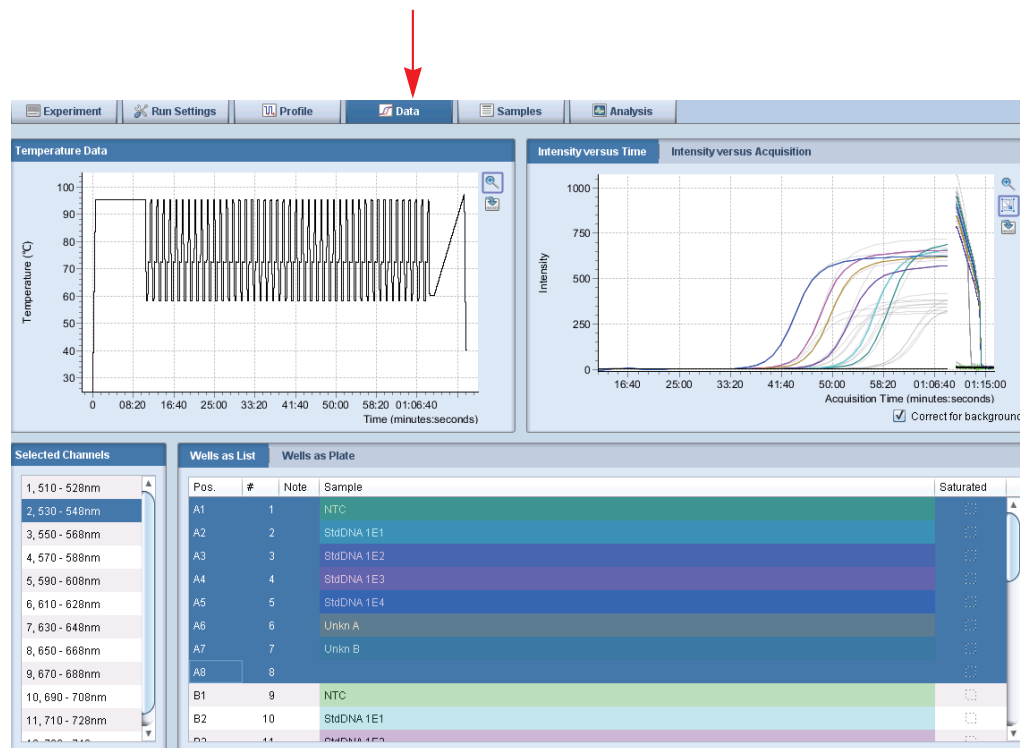


ステータスバーには現在のランの状況が表示されます。

- 3 **Data** タブを開き、実行中の実験の進行状況を表示させます (29ページの「**ランのモニタリング**」の項をご参照ください)。



Data (データ) タブのグラフと表の詳細については、「LightCycler® Nano Instrumentオペレータズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。



- 4 SYBR Green I 色素を使用している場合、**Selected Channels** ウィンドウにおいて 530 - 548 nm を選択します。

- 5 **Wells as List** タブまたは **Wells as Plate** タブを使って、グラフのウィンドウエリアに表示させるウェルを選択します。

- 6 グラフのウィンドウにおいて:

- ▶ 表示させるサンプルを選択します。
- ▶ **Correct for background** オプションにチェックを入れます。
- ▶ 曲線のツールチップを表示させ、情報を表示させます。

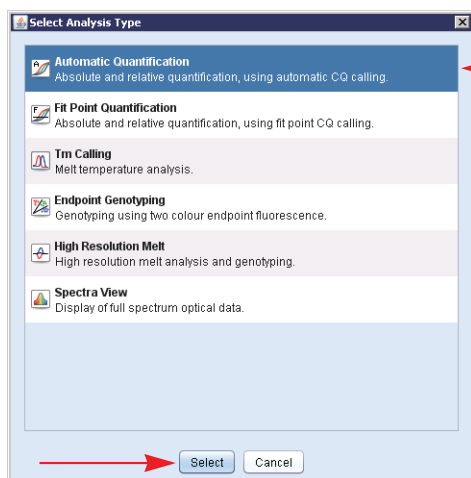
2.3 自動定量 (Automatic Quantification)

2.3.1 解析方法の設定

算出結果を表示させるために、解析タイプを設定します。この実験では、自動定量 (Automatic Quantification) を用いる絶対定量解析と Fit Point 定量 (Fit point Quantification) を用いる2番目の解析 (48ページの「[Fit Point 定量 \(Fit point Quantification\)](#)」の項をご参照ください) を指定します。SYBR Green I 色素を使用する場合は、さらに T_m Calling 解析を用いて定量結果を検証し、副産物の有無をチェックします (53ページの「 [\$T_m\$ Calling](#)」の項をご参照ください)。

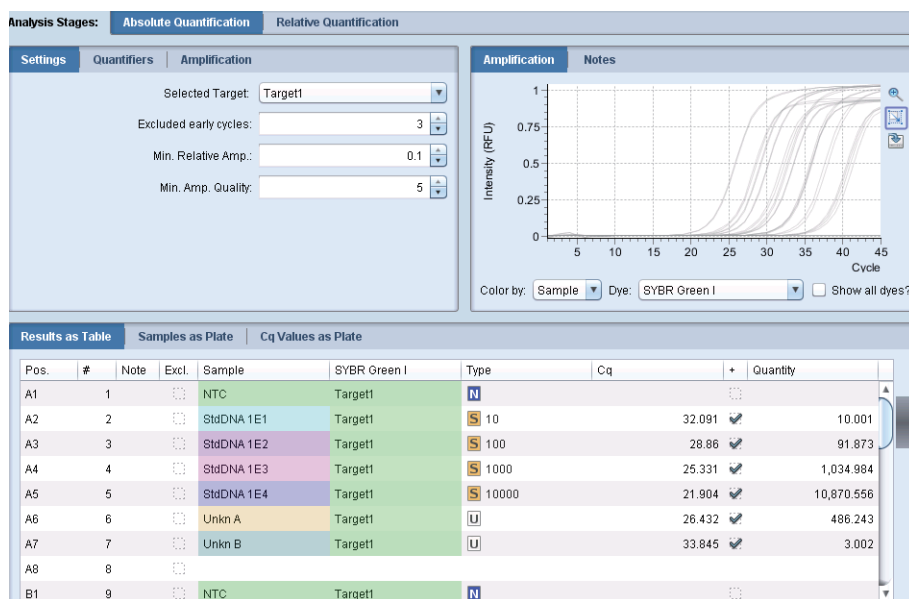
自動定量法の設定

- 1 Analysis タブを開きます (30ページの「[自動定量法 \(Automatic Quantification method\) の設定](#)」の項をご参照ください)。
- 2 Select Analysis ウィンドウエリアにて:
 - ▶ (画像)  をクリックし、新しい解析を追加します。Select Analysis Type ダイアログが開きます。
 - ▶ Automatic Quantification を選択し、Select をクリックします。



Absolute Quantification タブが表示され、Settings と Amplification タブにデフォルト値が表示されます。

Results as Table タブには、Samples タブの設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。



3 Settings タブにおいて:

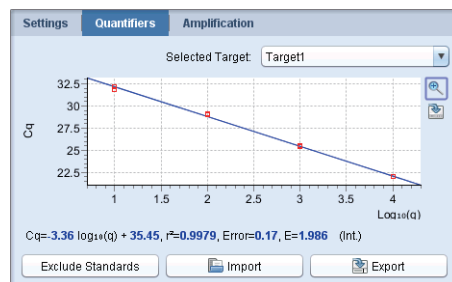
- ▶ 解析するターゲットを選択します。
- ▶ その他の設定には、この例ではデフォルト値を使います。

4 Quantifiers タブでは、算出された標準曲線を表示し、増幅の品質を評価します。効率 (E) 値は2が理想的な増幅であり、1サイクルで2倍に増幅されていることを示します。

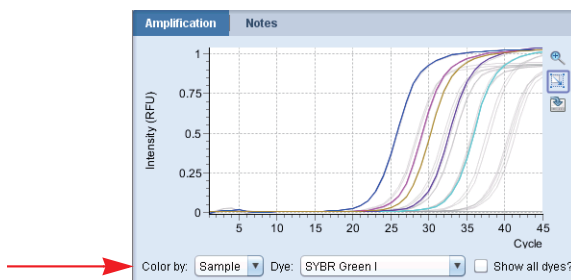
両方のターゲットに対して、同一ラン内の標準曲線を利用できるため、この標準曲線の効率を使って未知のサンプル量を算出します。



標準曲線の表示にはY軸切片が表示されます。X軸は算出された値が適切に表示されるように調節されます。

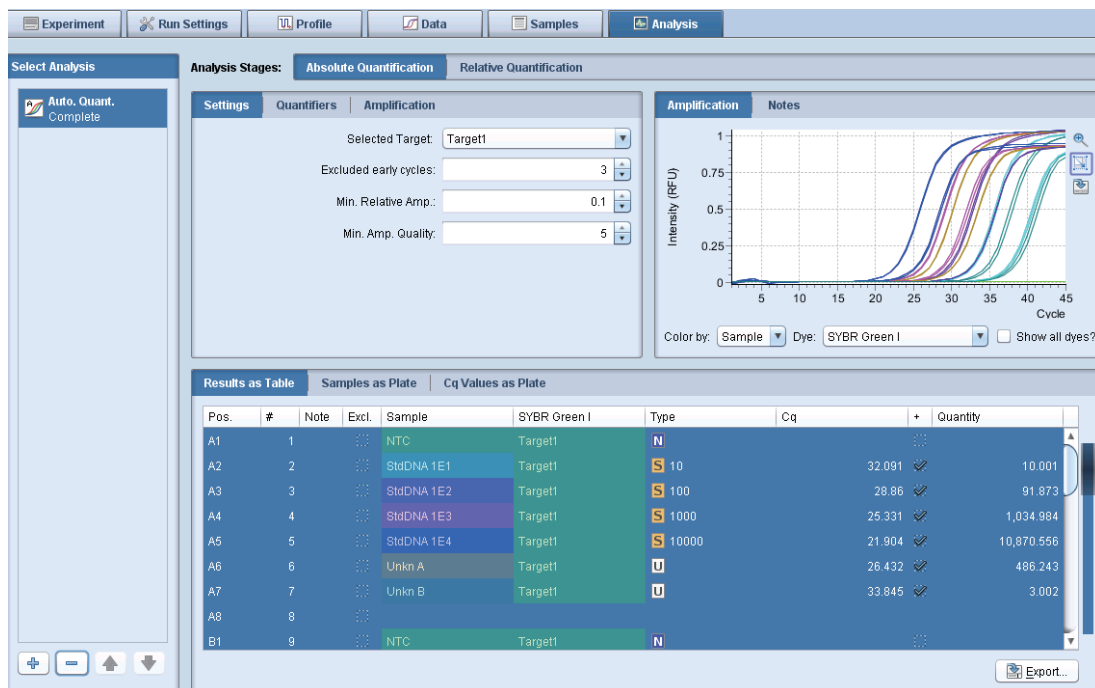


5 Amplification タブでは、曲線の色分けについて、by sample (サンプルごと) または by Cq values (Cq値ごと) を選択します。

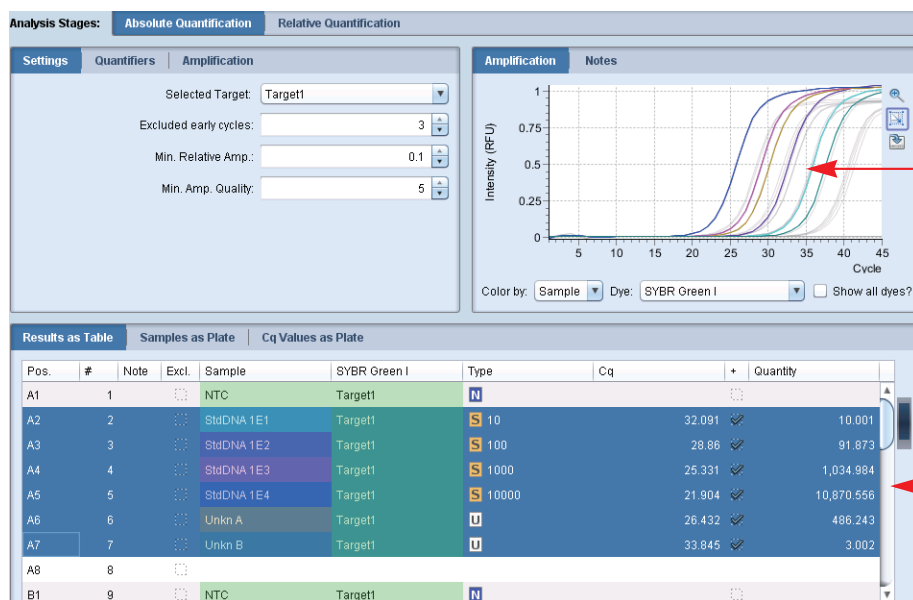


2.3.2 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、*Analysis* タブにより結果を表示します。

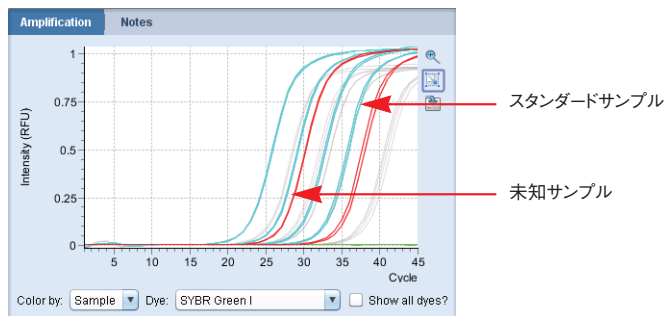


- 表示するサンプルを選択します。*Amplification* タブで選択されている曲線は、resultsウィンドウで選択しているサンプルに対応しています。



キーボードの[Ctrl]と[a]キーを使って「Results as Table」タブのすべてのサンプルを選択します。

- 2 オプション: 識別しやすくするため、すべてのスタンダードサンプルの曲線を同一の色に、未知サンプルの曲線を別の色にします。
色分けを行うには、*Samples* タブにてサンプルの色を変えます (23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。



- 3 resultsウィンドウエリアでは、見たいデータによって、*Results as Table* タブ、*Samples as Plate* タブ、または *Cq Values as Plate* タブを開きます。

Results as Table

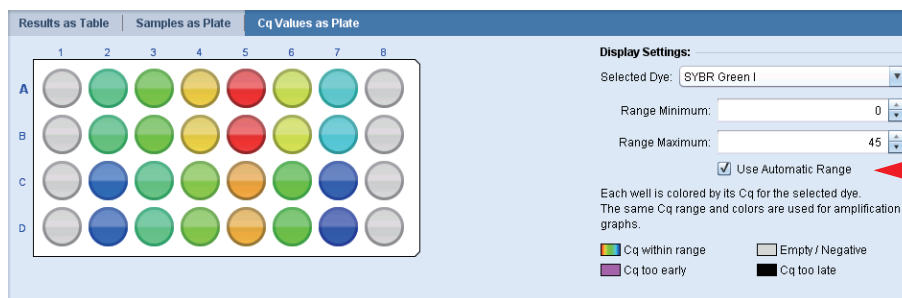
Results as Table (表で見る結果) タブは、スタンダードと未知サンプル量とCq値を表示します。未知のサンプルのCq値と量は、スタンダードのCq値と標準曲線を使って算出されます。下記の例では、サンプル *Unkn A* (未知のサンプルA) の濃度は標準曲線の範囲内にあり、サンプル *Unkn B* (未知のサンプルB) の濃度は標準曲線の範囲外です。

Results as Table									
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	SYBR Green I	Type	Cq	+	Quantity
A1	1			NTC	Target1	N			
A2	2			StdDNA 1E1	Target1	S 10	32.091	✓	10.001
A3	3			StdDNA 1E2	Target1	S 100	28.86	✓	91.873
A4	4			StdDNA 1E3	Target1	S 1000	25.331	✓	1,034.984
A5	5			StdDNA 1E4	Target1	S 10000	21.904	✓	10,870.556
A6	6			Unkn A	Target1	U	26.432	✓	486.243
A7	7			Unkn B	Target1	U	33.845	✓	3.002
A8	8								
B1	9			NTC	Target1	N			
B2	10			StdDNA 1E1	Target1	S 10	31.789	✓	12.304
B3	11			StdDNA 1E2	Target1	S 100	29.054	✓	80.418
B4	12			StdDNA 1E3	Target1	S 1000	25.456	✓	950.14

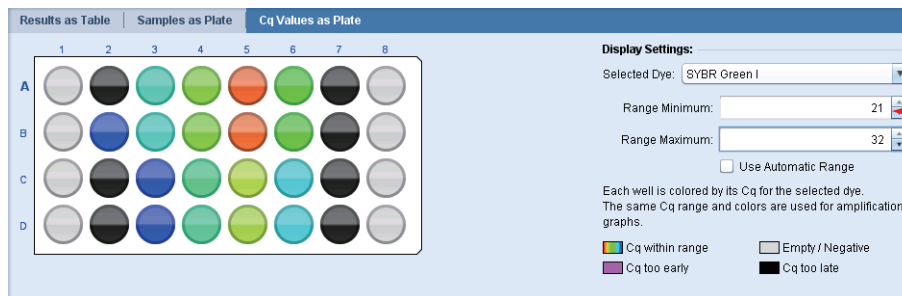
Cq Values as Plate

Cq Values as Plate (プレートで見るCq値) タブは、測定されたCq値のヒートマップを表示します。

- 1 表示設定を指定するには、*Display Settings* (表示設定) の該当するパラメータを修正します：
 - ▶ 自動的に色の割り当てを実施したい場合、*Use Automatic Range* にチェックを入れます。



- ▶ 標準曲線の範囲から外れたサンプルを明らかにするには、*Use Automatic Range* オプションのチェックを外し、*Range Minimum* に21、*Range Maximum* に32を入力します (スタンダードサンプルの最小 / 最大Cq値)。該当するサンプルは *Cq too early* または *Cq too late* として色づけされます。



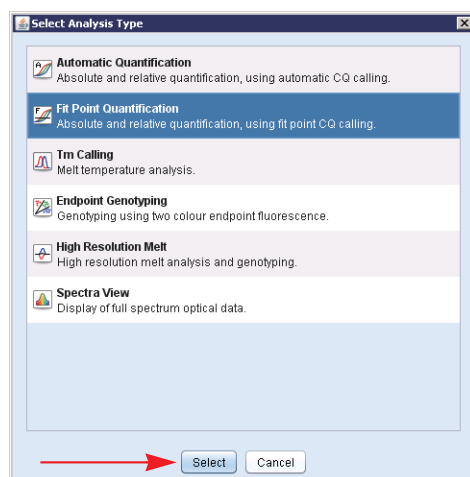
2.4 Fit Point 定量 (Fit point Quantification)

2.4.1 解析方法の設定

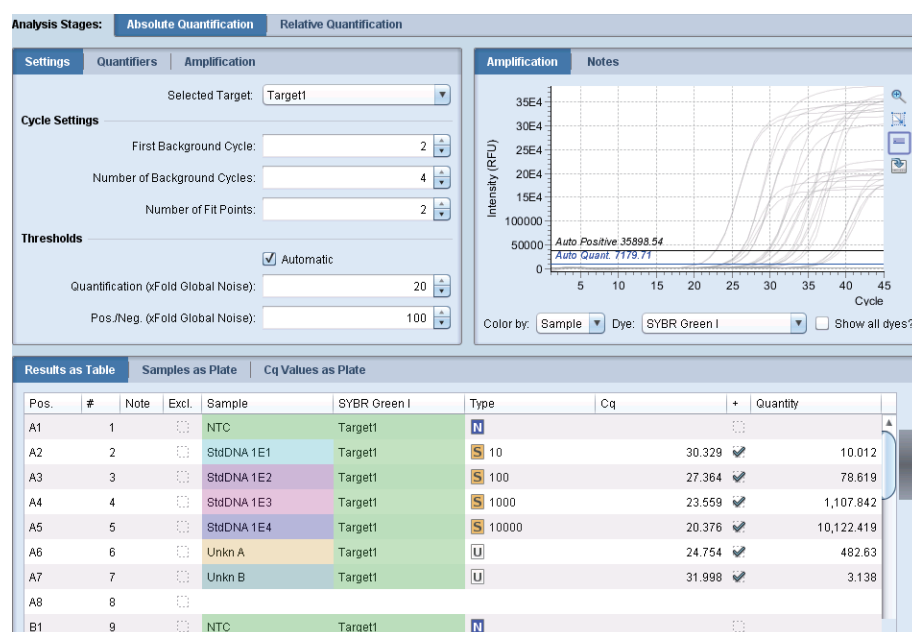
算出結果を表示させるために、解析タイプを設定します。本実験では、自動定量の絶対定量法 (43ページの「[自動定量 \(Automatic Quantification\)](#)」の項をご参照ください) と Fit Point 定量 (Fit point Quantification) を設定します。Fit Point 定量法 (Fit point Quantification method) では閾値の調整が必要で、考慮すべき Fit Point の数を入力して、対数変換した曲線 (log-transformed curve) に直線をフィットさせます。

Fit Point 定量法 (Fit point Quantification method) の設定

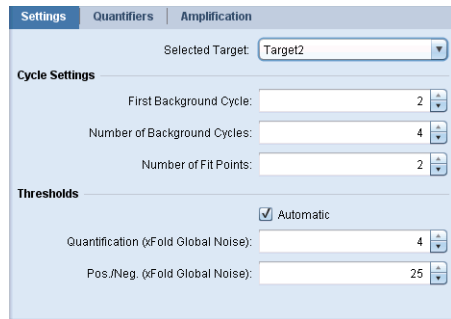
- 1 Analysisタブを開きます (30ページの「[自動定量法 \(Automatic Quantification method\) の設定](#)」の項をご参照ください)。
- 2 Select Analysis ウィンドウにて:
 - ▶ (画像)  をクリックし新しい解析を追加します。Select Analysis Type ダイアログが開きます。
 - ▶ Fit Point Quantification を選択し、Select をクリックします。



Absolute Quantification タブが表示され、Settings と Amplification タブにデフォルト値が表示されます。Results as Table タブには、Samples タブにおける設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。



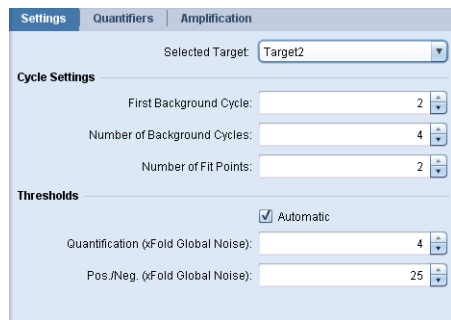
3 Settings タブにおいて、解析するターゲットを選択します。



4 Cycle Settings の設定:

- ▶ *First Background Cycle* のフィールドでは、その曲線のバックグラウンドを算出するための最初のサイクルを指定します。
- ▶ *Number of Background Cycles* のフィールドでは、その曲線のバックグラウンドの計算に使用するサイクルの数を指定します。
- ▶ *Number of Fit Points* の欄に、*fit points* の数を指定します。

この例ではデフォルト値を使います。




5 Thresholds の設定:

- ▶ 閾値を自動的に算出する場合、Automatic オプションにチェックを入れます。この例では、Automatic オプションを使います。

Settings | Quantifiers | Amplification

Selected Target: Target2

Cycle Settings

First Background Cycle: 2

Number of Background Cycles: 4

Number of Fit Points: 2

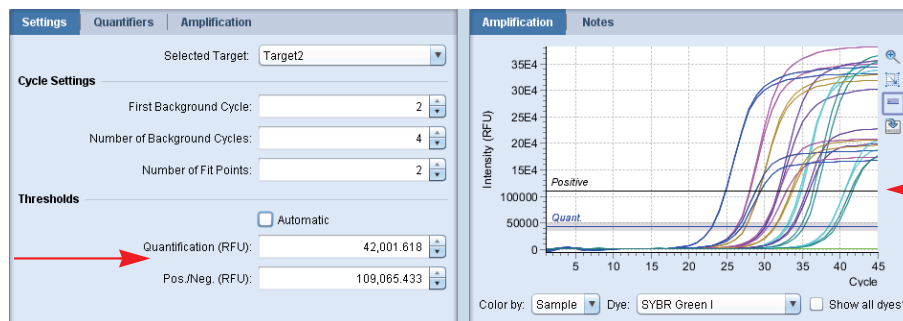
Thresholds

☒ Automatic

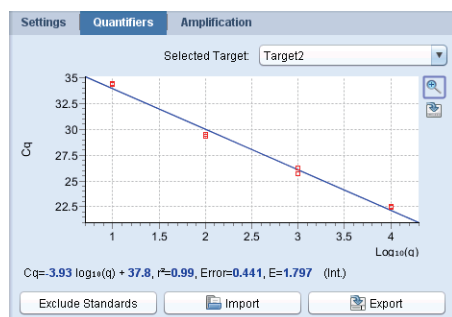
Quantification (xFold Global Noise): 4

Pos./Neg. (xFold Global Noise): 25

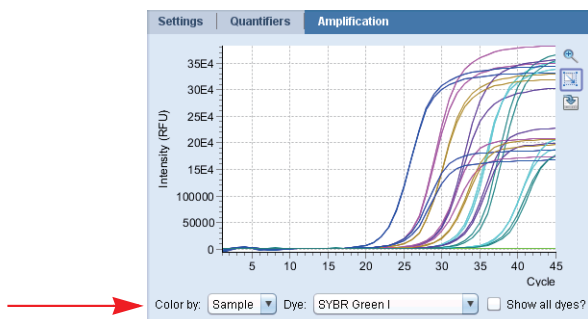
- ▶ 閾値を手動で設定するには、Automatic オプションのチェックを外します。
 - ▶ Amplification タブの (画像) をクリックします。
 - ▶ Quantification スライダーを使って Cq 値の算出に用いる閾値の位置を決めます。
 - ▶ Pos./Neg. (陽性 / 陰性) スライダーを使って、曲線に対して陽性または陰性を判定するための閾値の位置を決めます。



6 Quantifiers タブでは、算出された標準曲線を表示し、増幅の品質を評価します。効率 (E) 値は 2 が理想的な増幅であり、1 サイクルで 2 倍に増幅されていることを示します。

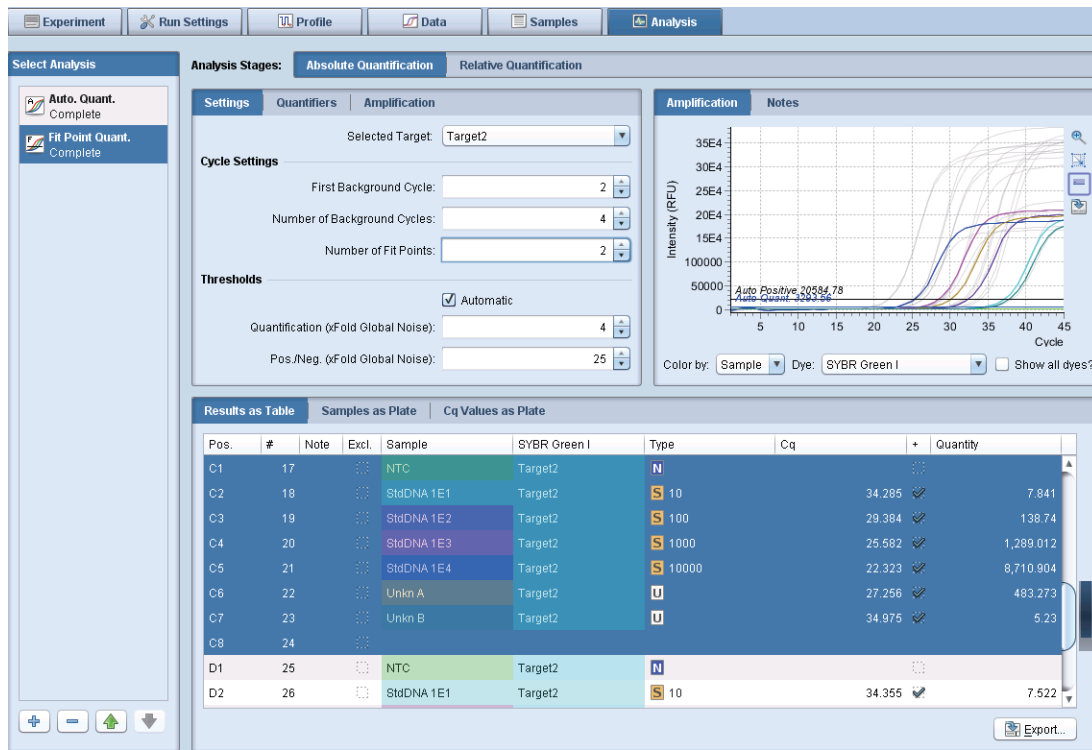


7 Amplification タブでは、曲線の色分けについて、by sample (サンプルごと) または by Cq values (Cq 値ごと) を選択します。

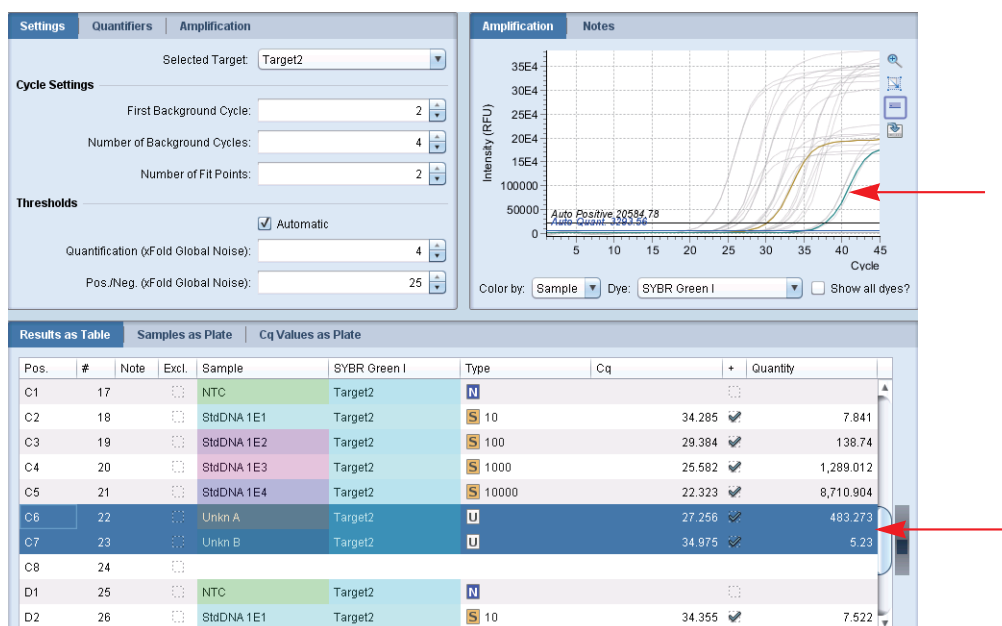


2.4.2 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、Analysis タブで Cq 値などの結果を確認します。



- 表示させるサンプルを選択します。Amplification タブで選択された曲線は、results ウィンドウで選択されたサンプルに対応しています。



- キーボードの [Ctrl] と [a] キーを使って「Results as Table (表で見る結果)」タブのすべてのサンプルを選択します。

- results ウィンドウでは、見たいデータによって、Results as Table (表で見る結果) タブ、Samples as Plate (プレートで見るサンプル) タブ、または Cq Values as Plate (プレートで見る Cq 値) タブを開きます。

Results as Table

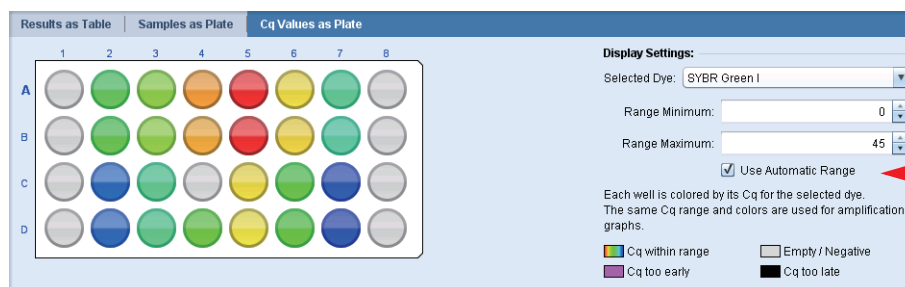
Results as Table (表で見る結果) タブには、スタンダードと未知のサンプル量とCq値を表示します。未知のサンプルのCq値と量は、スタンダードのCq値と標準曲線を使って算出されます。下記の例では、サンプル *Unkn A* (未知のサンプルA) の濃度は標準曲線の範囲内にあり、サンプル *Unkn B* (未知のサンプルB) の濃度は標準曲線の範囲外にあります。

Results as Table									
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	SYBR Green I	Type	Cq	+	Quantity
C1	17			NTC	Target2	N			
C2	18			StdDNA 1E1	Target2	S 10	34.285	✓	7.841
C3	19			StdDNA 1E2	Target2	S 100	29.384	✓	138.74
C4	20			StdDNA 1E3	Target2	S 1000	25.582	✓	1,289.012
C5	21			StdDNA 1E4	Target2	S 10000	22.323	✓	8,710.904
C6	22			Unkn A	Target2	U	27.256	✓	483.273
C7	23			Unkn B	Target2	U	34.975	✓	5.23
C8	24								
D1	25			NTC	Target2	N			
D2	26			StdDNA 1E1	Target2	S 10	34.355	✓	7.522
D3	27			StdDNA 1E2	Target2	S 100	29.276	✓	147.827

Cq Values as Plate

Cq Values as Plate (プレートで見るCq値) タブには、測定されたCq値のヒートマップが表示されます。

- 表示設定を指定するには、*Display Settings* の該当するパラメータを修正します。
この例では、*Use Automatic Range* オプションにチェックを入れてあり、色の割り当てには自動的な色の範囲の選択を使用しています。



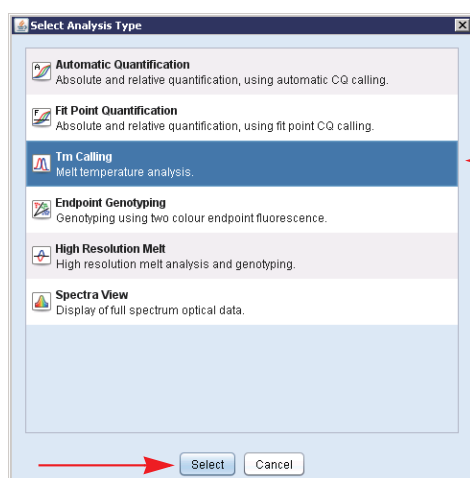
2.5 T_m Calling

2.5.1 解析方法の設定

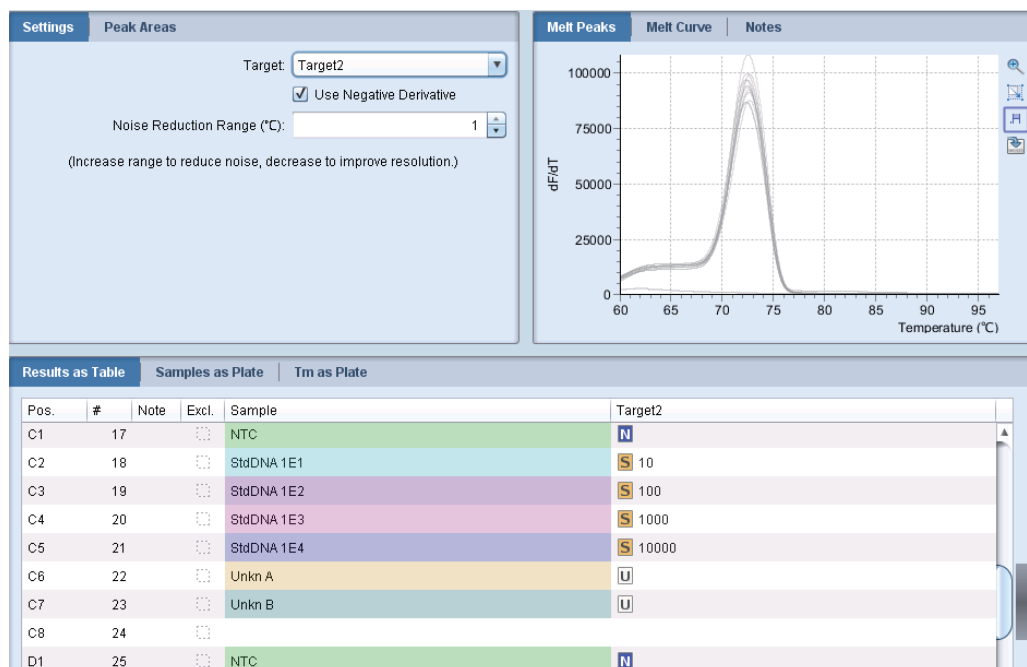
この実験では SYBR Green I を使用しており、PCR産物の T_m の特定による定量結果の検証と非特異的副産物の有無の確認のため、 T_m Callingの解析が必要となります。

T_m Calling 解析のセットアップ

- 1 Analysisタブを開きます (30ページの「[自動解析法の設定](#)」の項をご参照ください)。
- 2 Select Analysis ウィンドウにおいて:
 - ▶ (画像)  をクリックし新しい解析を追加します。Select Analysis Type ダイアログが開きます。
 - ▶ T_m Calling を選択し、Select をクリックします。



- 3 算出されたデータを表示するには、Settingsタブで表示したいターゲットを選択します。Analysisタブが表示され、SettingsタブとMelt Peaksタブにはデフォルト値が表示されます。



4 Settings タブでは:

- ▶ 解析するターゲットを選択します。
- ▶ 下記の例では、その他の設定はデフォルト値を使います:
Use Negative Derivative のオプションを選択し、Noise Reduction Range を1に設定します。

Settings Peak Areas

Target: Target2

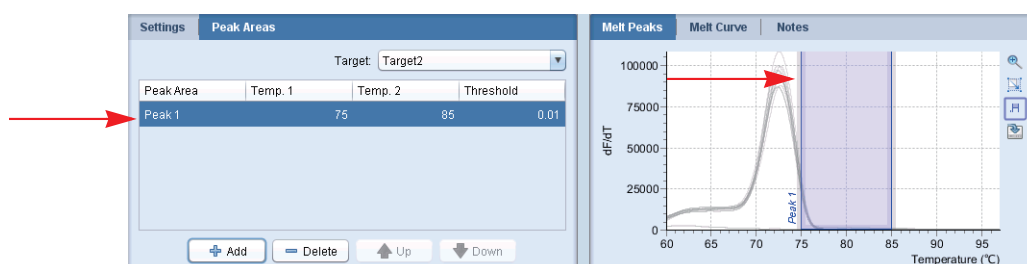
☒ Use Negative Derivative

Noise Reduction Range (°C): 1

(Increase range to reduce noise, decrease to improve resolution.)

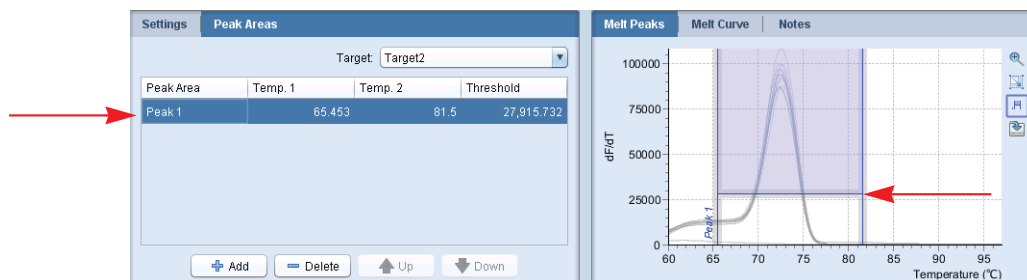
5 Peak Areas タブを開き、(画像) をクリックし新しい peak area を追加します。新しい peak area がデフォルトの温度範囲と threshold で表示されます:

- ▶ Peak Areas タブに表として示されています。
- ▶ Melt Peaks タブでは、グラフにハイライトされた領域として示されます。

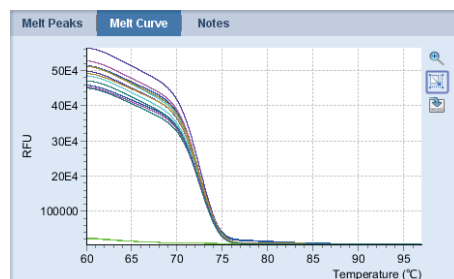


6 Melt Peaks タブにある(画像) をクリックすることでハイライトされた領域をスライドさせ、最大値が自動的に T_m 値として使われるピーク領域の位置を決めます。

- ▶ ハイライト領域の両端が予測されるピーク最大値を挟むように配置させ、ハイライト領域の端が曲線の最大値とならないようにしてください。



7 Melt Curve タブを開き融解曲線を表示させます(温度に対する蛍光強度の生データ)。

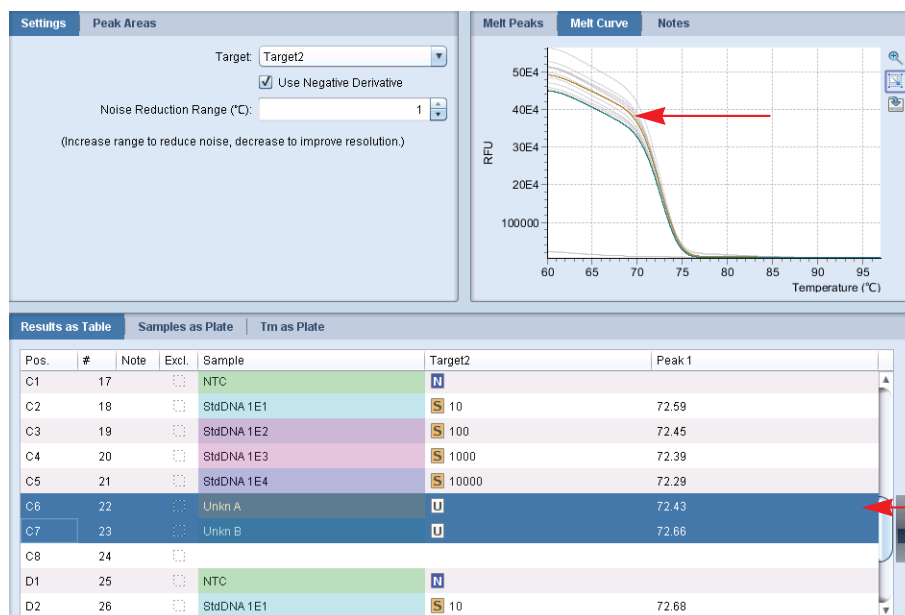


2.5.2 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、Analysis タブで結果を確認します。



- 表示させるサンプルを選択します。Melt Peaks または Melt Curve タブにおいて選択される曲線は、results ウィンドウで選択するサンプルに対応しています:



キーボードの [Ctrl] と [a] キーを使って「Results as Table」タブのすべてのサンプルを選択します。

2

results ウィンドウでは、見たいデータによって、Results as Table (表で見る結果) タブ、Samples as Plate (プレートで見るサンプル) タブ、または T_m as Plate (プレートで見る T_m 値) タブを開きます。

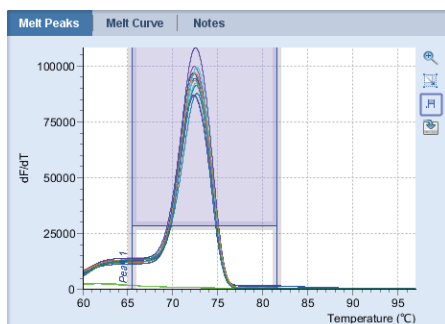
Results as Table

Results as Table (表で見る結果) タブには各々のピーク領域とウェルに、同定されたピークの融解温度 (T_m) が表示されます。ピークがない場合、表のセルはブランクです。

Results as Table						
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	Target2	Peak 1
C1	17			NTC	N	
C2	18			StdDNA 1E1	S 10	72.59
C3	19			StdDNA 1E2	S 100	72.45
C4	20			StdDNA 1E3	S 1000	72.39
C5	21			StdDNA 1E4	S 10000	72.29
C6	22			Unkn A	U	72.43
C7	23			Unkn B	U	72.66
C8	24					
D1	25			NTC	N	
D2	26			StdDNA 1E1	S 10	72.68
D3	27			StdDNA 1E2	S 100	72.51

Melt Peaks

Results as Table (表で見る結果) タブに従い、Melt Peaks (融解ピーク) タブには1つの融解ピークが表示され、本実験では副産物が検出されなかったことを意味しています。



T_m as Plate

T_m as Plate (プレートで見る T_m 値) タブには選択されたピーク領域の融解温度のヒートマップが表示されます。

- 3 表示設定を指定するには、Peak Area for Plate Display (プレート表示のピーク領域) の該当するパラメータを修正します:
- 表示させるピーク領域を選択します。自動的に色の割り当て範囲を決定する場合、Use Peak Area Range オプションにチェックを入れます。

3 ターゲット2種類とリファレンス2種類を用いたキャリブレーターを含む相対定量

相対定量解析では、単一のサンプル中の2種類の遺伝子配列の量を比較し（例、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子）、これらの遺伝子のratioで最終結果を表します。

このratioは単位のない数値であり、他のサンプルのratioと比較することで有意となります。この比較を行う際に最も一般的な方法は、サンプルの1つをキャリブレーターとして指定する方法です。他の全サンプルをキャリブレーターと比較します。最終結果を標準化するため、各サンプルのターゲット／リファレンスの ratio をキャリブレーターサンプルのターゲット／リファレンスのratio で割ります（キャリブレーターの標準化された値は1です）。

下記の例では、2種類の未知のサンプルのためにリファレンス遺伝子2種類とターゲット遺伝子2種類をセットアップしランする方法を説明しています。3つ目のサンプルはキャリブレーターとして使用します。一方のターゲット遺伝子のために、同一ラン内のスタンダードが含まれます。

サンプル	ヒト組織RNA（心臓、腎臓、肝臓）由来のcDNAサンプル 肝臓サンプルはキャリブレーターとして使用します。
試薬	▶ FastStart Essential DNA Probes Master (2×濃度) ▶ 遺伝子4種類の各Forwardプライマー: 最終濃度400 nM ▶ 遺伝子4種類の各Reverseプライマー: 最終濃度400 nM ▶ Target1 (ターゲット1用): UPL Probe #164 (FAM)、反応液中の最終濃度200 nM ▶ Target2 (ターゲット2用): UPL Probe #111 (FAM)、反応液中の最終濃度200 nM ▶ Reference1 (リファレンス配列1用): UPL Probe #60 (FAM)、反応液中の最終濃度200 nM ▶ Reference2 (リファレンス配列2用): UPL Probe #117 (FAM)、反応液中の最終濃度200 nM

3.1 サンプルのセットアップ

サンプルをセットアップするにあたって、まず4種類のPCRミックスとサンプル希釈液を準備します。



セットアップの間、反応チューブは氷上に置き、サンプルとPCRミックスを冷却してください。

PCRミックス

下記の通り4種類のPCRミックスを準備します:

- ▶ Target1を含むPCRミックスは、20 µlを反応11回分。
- ▶ Target2、Reference1、Reference2それぞれを含むPCRミックスは、20 µlを反応7回分。

下記の通り各ターゲット特異的なPCRミックスを作成します:

試薬	µl/反応
H ₂ O	1.4
FastStart Essential DNA Probes Master (2×濃度)	10
Forwardプライマー (5 µM)	1.6
Reverseプライマー (5 µM)	1.6
UPL probe (10 µM)	0.4
PCRミックス(上記の混合液)	15
サンプル	5
反応液	20

サンプルの希釈

各サンプルを 1 ng RNA 相当/反応に希釈し、肝臓サンプルを使って *Target 1* のためのスタンダード希釈液を作成します。

ピペッティングスキーム

- 1 下図の通り、ターゲット特異的PCRミックス15 µlを、LightCycler® 8-Tube Strips (clear)の各チューブへと分注します。



	1	2	3	4	5	6	7	8
StripA	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1	Target1
StripB	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target2	Target1
StripC	Reference 1	Reference 1	Reference 1	Reference 1	Reference 1	Reference 1	Reference 1	Target1
StripD	Reference 2	Reference 2	Reference 2	Reference 2	Reference 2	Reference 2	Reference 2	Target1

- 2 下記の図の通り、各希釈液5 µlを各チューブへ分注します。



ウェルA8、B8、C8、D8には特定の濃度のスタンダードが含まれます。肝臓サンプルはキャリブレーターです。

	1	2	3	4	5	6	7	8
StripA	心臓	心臓	腎臓	腎臓	肝臓	肝臓	H ₂ O	25,000
StripB	心臓	心臓	腎臓	腎臓	肝臓	肝臓	H ₂ O	2,500
StripC	心臓	心臓	腎臓	腎臓	肝臓	肝臓	H ₂ O	250
StripD	心臓	心臓	腎臓	腎臓	肝臓	肝臓	H ₂ O	25

遠心

- 1 ストリップのキャップを正しい位置にしっかりと押し付け、チューブを閉じます。
 完全に閉じられていることを確認してください。完全に閉じていなければランの間に中身が蒸発する恐れがあります。
- 2 安全に遠心するために、チューブストリップを標準の96穴MWPに設置します(17ページの「[遠心](#)」の項をご参照ください)。
- 3 MWPに入れたチューブを3,000 x gで最長30秒間遠心します。



3.2 実験のプログラミングと実行



実験のセットアップとランの方法の詳細については18ページの「[実験のプログラミングと実行](#)」の項をご参照ください。

3.2.1 光学系の設定

1 新規の実験を作成します (18ページの「[実験の作成](#)」の項をご参照ください)。

2 *Run Settings* タブを開きます。

Optics Settings ウィンドウエリアにおいて:

- ▶ この実験ではFAM色素を使用するため *Hydrolysis Probes* のオプションを選択します (62ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
- ▶ *Normal Quality* オプションを選択し、光学系取得の品質を設定します。

Optics Settings

Please select the brightest dye present in any well.
If you are unsure, use the 'Intercalating Dyes' option.

☐ **Intercalating Dyes** (SYBR Green I, ResoLight)

☒ **Hydrolysis Probes** (FAM, VIC, HEX, Yellow 555, Red 610, TexasRed, Cy5)

☐ **Other Dyes**

The instrument can increase signal quality by acquiring for longer on each cycle of amplification, after the hold is complete.
Please select desired signal quality - if you are unsure, use the 'Normal Quality' option.

☐ **High Quality**

☒ **Normal Quality**

☐ **High Speed**

The instrument can automatically find the best settings to use during melting.
If this option is selected, the acquisition time will depend on dye intensity.
If the option is not selected, the same settings selected above will be used throughout the run.

☐ Optimize Melt Acquisitions

☐ Use Advanced Settings

☐ Display Dye Calibrations

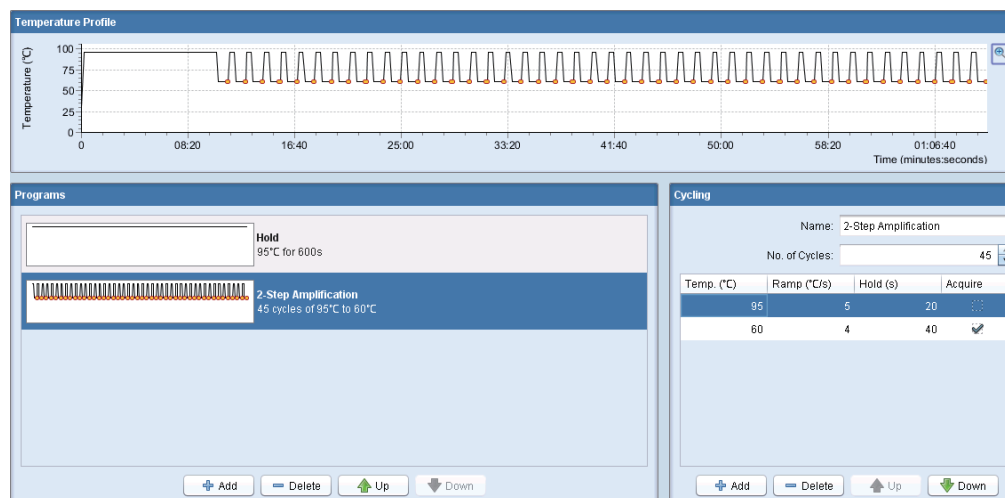
3.2.2 プロファイルの作成

この例では、下記の加熱と冷却サイクルを使います:

Program		Temp(°C)	Ramp(°C/s)	Hold(s)	
Hold		95	4	600	
2-Step Amplification	45 Cycles	95	5	20	
		60	4	40	Acquire

対応するプロファイルの設定

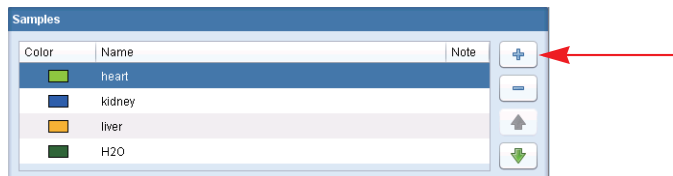
- 1 *Profile* タブを開きます。
- 2 *Programs* ウィンドウエリアで、プログラムを追加し上表にリストされているように設定します (20 ページの「[プロファイルの作成](#)」の項をご参照ください)。
- 3 *Temperature Profile* で、設定した実験プロトコル全体をグラフで確認します。グラフで時間と温度サイクルを確認し、必要に応じてプログラムと設定温度を修正します。



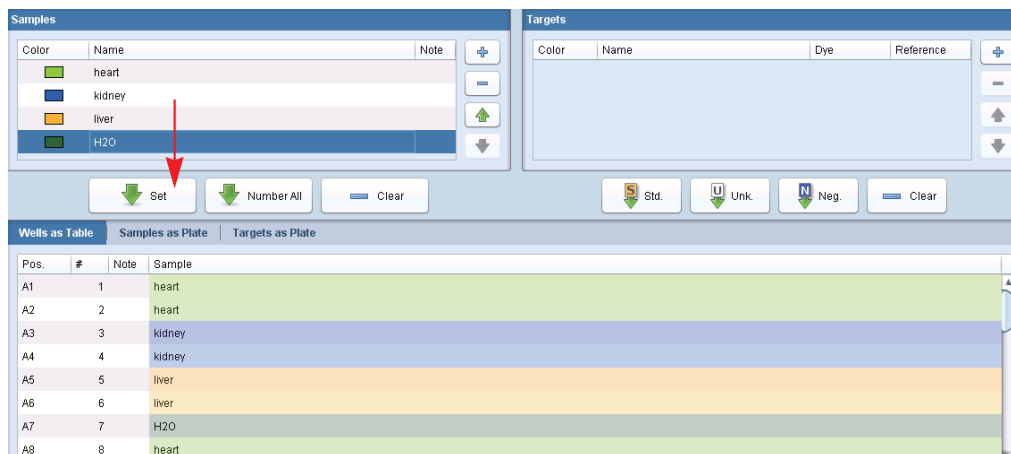
3.2.3 サンプルとターゲットの編集

サンプルの編集と割り当て

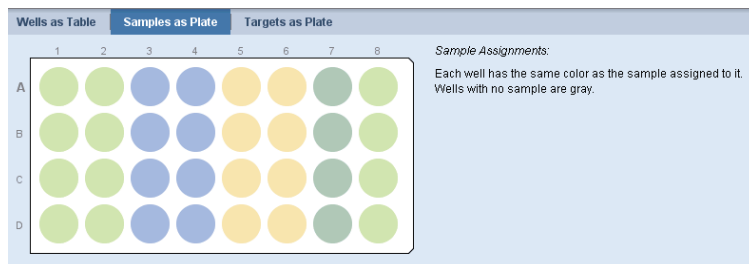
- 1 *Samples* タブを開きます。
- 2 *Samples* ウィンドウエリアで (画像)  をクリックし、解析に応じて 4 サンプル追加します (23 ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。この例では、下記のサンプル名を設定します:
 - ▶ 未知のサンプル用として、*heart* (心臓)、*kidney* (腎臓)、*liver* (肝臓) を設定し、*heart* (心臓) サンプルはスタンダードとしても使います。
 - ▶ ネガティブコントロールとして *H2O* を設定します。



- 3 サンプルをウェルに割り当てます (23 ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
 - ▶ *Sample1* を選択します。
 - ▶ *Wells as Table* タブまたは *Samples as Plate* タブにおいて下記のウェルを選択します:
 - A1, A2,
 - B1, B2,
 - C1, C2,
 - D1, D2
 - ▶ *Set* をクリックします。



- 4 ステップ 3 を繰り返し、58 ページの「[ピペッティングスキーム](#)」に従って他のサンプルとスタンダード希釈液も設定します。こうして *Wells as Table* と *Samples as Plate* タブに、割り当てられたサンプルが表示されます:



ターゲットの編集と割り当て

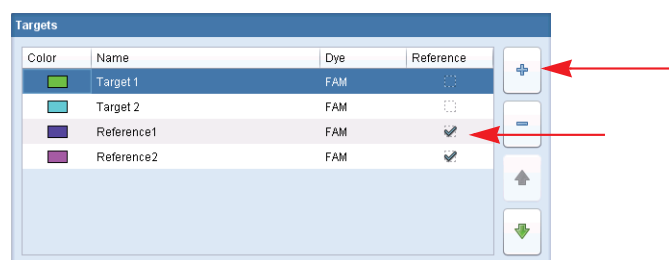
ターゲットは58ページの「[ピペッティングスキーム](#)」に従って割り当てます。サンプルの設定に従い、standard (スタンダード)、negative (陰性)、またはunknown (未知量のサンプル)として割り当てます:

- ▶ ウェルA1~A4、B1~B4、C1~C4、D1~D4には未知量のサンプル *Sample1*と *Sample2*が含まれます。
- ▶ ウェルA5、A6、B5、B6、C5、C6、D5、D6には *Sample3*が含まれ、キャリブレーターとして使用されます。サンプルはラン終了後にのみ、*Analysis*タブにおいてキャリブレーターとして設定されます。(67ページの「[結果の解析](#)」の項をご参照ください)。これらのウェルのターゲットも *Unknown*として割り当てます。
- ▶ ウェルA7、B7、C7、D7にはネガティブコントロールが含まれます。これらのウェルのターゲットは *Negative*として割り当てます。
- ▶ ウェルA8、B8、C8、D8には特定の濃度のスタンダードが含まれます。これらのウェルのターゲットは *Standard*として割り当てます。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC	Standard
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC	Standard
C	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC	Standard
D	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	NTC	Standard

- 1 *Targets*ウィンドウでは、(画像)  をクリックし4つの新しいターゲットを追加します (25ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。

- ▶ 必要に応じてターゲット名を変更します。
- ▶ 4つのターゲットすべてに対して、*FAM*色素を割り当てます。
- ▶ *Reference1*と *Reference2*の *Reference* (リファレンス) 欄にチェックを入れて、リファレンスとして設定します。



- 2 未知量のターゲットをウェルに割り当てます:

- ▶ *Target1*を選択します。
- ▶ *Wells as Table*タブまたは *Samples as Plate* タブにおいて、ウェルA1~A6を選択します。
- ▶ *Unk.* (未知) をクリックし選択したウェルに追加します。

- 3 ネガティブコントロールを割り当てます:

- ▶ *Target1*を選択します。
- ▶ *H₂O*サンプルを含むウェルA7を選択します。
- ▶ *Neg.* をクリックし選択したウェルに追加します。



4 スタンダード希釈系列を割り当てます:

- ▶ *Target1* を選択します。
- ▶ スタンダードを含むウェル A8 を選択します。
- ▶ *Std.* をクリックし、選択したウェルに追加します。
- ▶ *Input* ダイアログボックスに、スタンダード量として 25,000 を入力します。

Pos.	#	Note	Sample	FAM	Type
A3	3		kidney	Target1	U
A4	4		kidney	Target1	U
A5	5		liver	Target1	U
A6	6		liver	Target1	U
A7	7		H2O	Target1	N
A8	8		heart	Target1	S 25000
B1	9		heart		
B2	10		heart		

5 ステップ2~4を繰り返し、58ページの「ビベッティングスキーム」に従って、*Target2*、*Reference1*、*Reference2*を他のウェルに割り当てます。

Wells as Table タブと *Targets as Plate* タブには、対応するウェルに割り当てられた情報が表示されます:

Target Assignments:
Select a target above to display whether it is an unknown, standard, negative or empty in each well. If multiple targets are selected, the first one is displayed.

Key:
 ■ Unknown
 ■ Standard
 ■ Negative
 ■ Empty

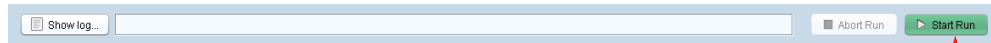
実験の保存

1 メインウィンドウのexperiment bar において:

- ▶ *Save* をクリックし、現在開いている実験を保存します。まだファイルがなければ、*Save* ダイアログボックスが開きます。
- ▶ *Save As* をクリックし、実験を特定の場所に保存します。*Save As* ダイアログボックスが開きます (27ページの「[実験の保存](#)」の項をご参照ください)。

3.2.4 実験の実行

- 1 LightCycler® Nano Instrumentにサンプルのチューブストリップを設置します。
(28ページの「[実験の実行](#)」の項をご参照ください)
- 2 ステータスバーのStart Runをクリックします。必要な場合、実験を保存するよう求められます。

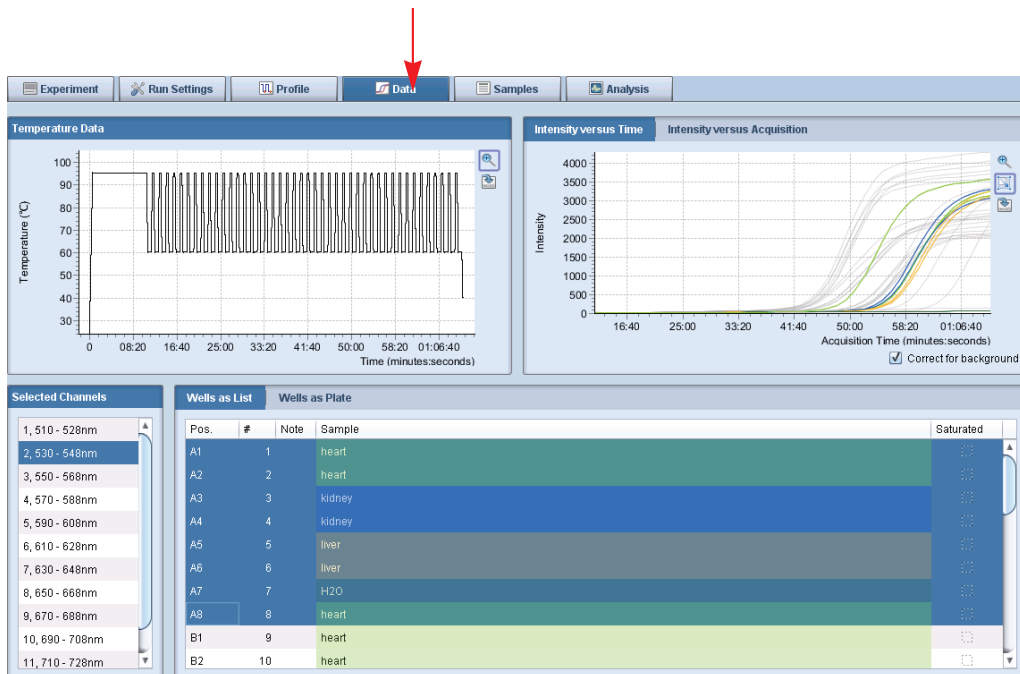


ステータスバーには現在のランの状況が表示されます。

- 3 Data タブを開き、実行中の実験の進行状況を確認します (29ページの「[ランのモニタリング](#)」の項をご参照ください)。



Data タブのグラフと表の詳細については、「LightCycler® Nano Instrumentオペレータズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。



- 4 FAM色素使用時は、Selected Channelsウィンドウで530 -548 nmを選択します。
- 5 Wells as Listタブまたは Wells as Plateタブを使って、グラフに表示させるウェルを選択します。
- 6 グラフのウィンドウにおいて:
 - ▶ 表示させるサンプルを選択します。
 - ▶ Correct for background オプションにチェックを入れます。
 - ▶ 曲線のツールチップを表示させ、情報を確認します。

3.3 解析方法の設定

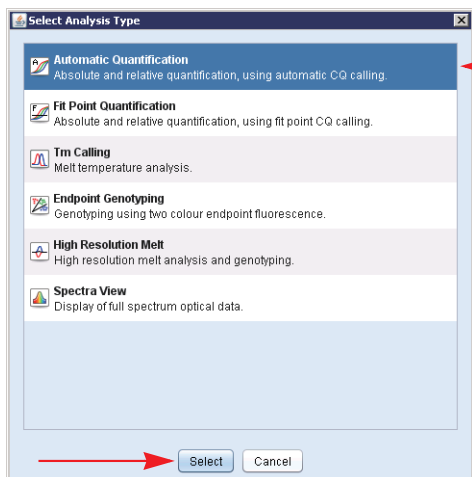
算出結果を表示させるために、解析タイプを設定します。この実験では、相対定量による自動定量解析を使用します。

自動定量法 (Automatic Quantification method) の設定

1 Analysis タブを開きます。(30ページの「[自動定量法 \(Automatic Quantification method\) の設定](#)」の項をご参照ください)。

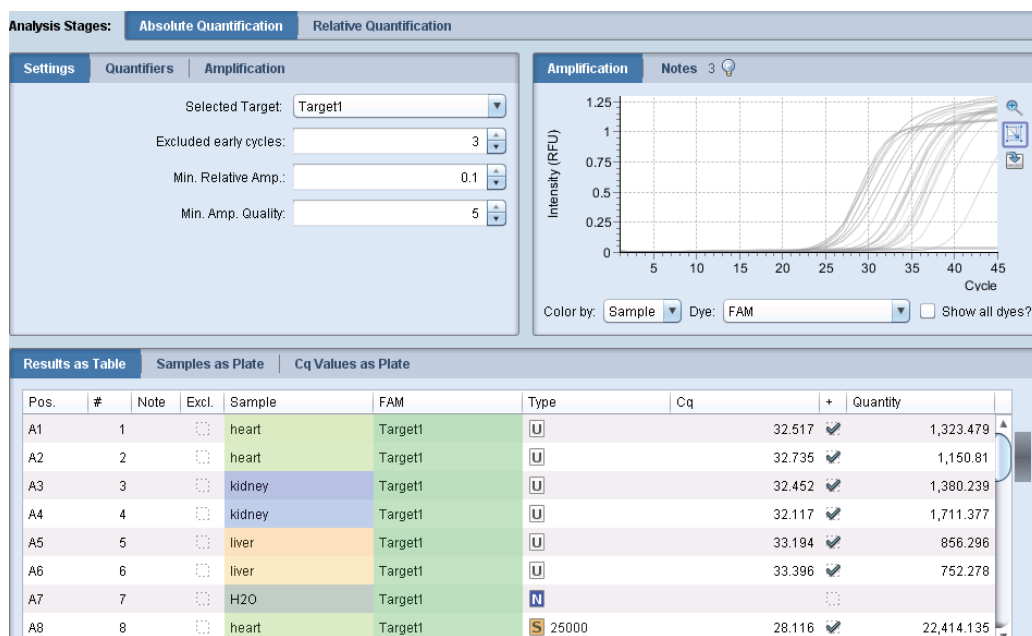
2 Select Analysis ウィンドウにおいて:

- ▶ (画像)  をクリックし新しい解析を追加します。Select Analysis Type ダイアログが開きます。
- ▶ Automatic Quantificationを選択し、Selectをクリックします。



Absolute Quantificationタブが表示され、SettingsとAmplificationタブにデフォルト値が表示されます。

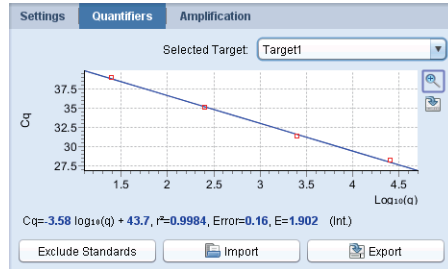
Results as Tableタブには、Samplesタブにおける設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。



3 Quantifiers タブを開き、Target1 を選択します。

Quantifiers タブには Target1 の標準曲線が表示されます。

Target1 に対しては同一ラン内の標準曲線があるため、その標準曲線の効率 (E) を使って、効率補正した Cq 値と相対量を算出することができます。



4 他のターゲットのターゲット特異的な効率値を設定します:

- ▶ Target2 を選択します。
- ▶ この実験では、デフォルト値を使います:
Exclude Standards オプションを選択します。
Efficiency フィールドにおいて、効率の値として「2」が設定されます。



- ▶ Reference1 と Reference2 に対しても上記ステップを繰り返します。

5 Analysis Stages バーで Relative Quantification を選択します。

6 キャリブレーターを割り当てます:

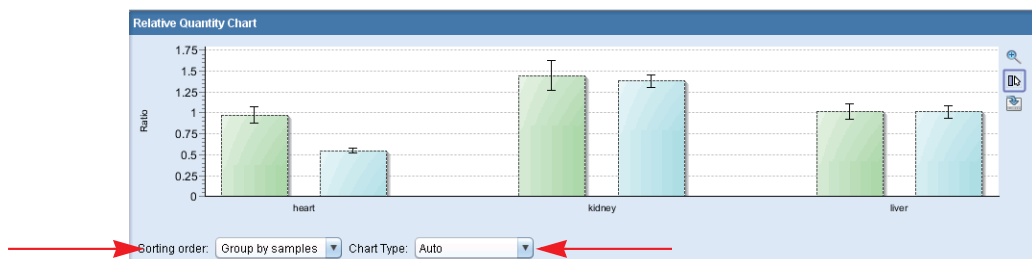
- ▶ results ウィンドウで、Samples タブを開きます。
- ▶ Calibrator のカラムで、Sample3 を選択します。

Samples			
Color	Name	Note	Calibrator
■	heart		☐
■	kidney		☐
■	liver		☒
■	H2O		☐

ΔCq 値のあるサンプルとターゲットそれぞれに対して、ΔΔCq 値が算出されます (68 ページの「[解析結果](#)」の項をご参照ください)。

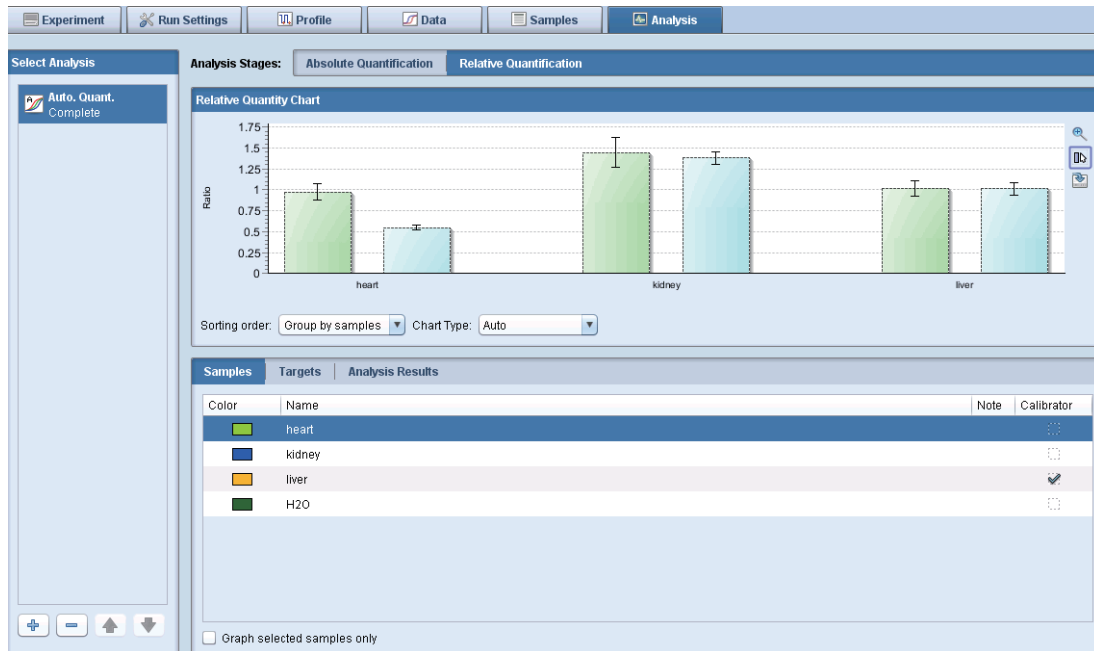
7 グラフのウィンドウエリアにおいて:

- ▶ Bar のグループ分けについて、by samples (サンプルごと) または by targets (ターゲットごと) を選択します。
- ▶ Bar の表示 (Chart Type) について、Ratio または Normalized ratio を選択します。



3.4 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、*Analysis* タブにて結果を確認します。



- 1 オプション: 陰性のサンプルや蛍光強度の低いサンプルを計算から除外します。
 - ▶ *Absolute Quantification* タブを開きます。
 - ▶ Resultsウィンドウエリアで、*Results as Table* (表で見る結果) タブを開きます。
 - ▶ *Excl.* のコラムで、除外対象のサンプルを選択します。

Results as Table									
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	FAM	Type	Cq	+	Quantity
A1	1			heart	Target1	U	32.517	✓	1,323.479
A2	2		✓	heart	Target1	U			
A3	3			kidney	Target1	U	32.452	✓	1,380.239
A4	4			kidney	Target1	U	32.117	✓	1,711.377
A5	5			liver	Target1	U	33.194	✓	856.296
A6	6			liver	Target1	U	33.396	✓	752.278
A7	7			H2O	Target1	N			
A8	8			heart	Target1	S 25000	28.116	✓	22,414.135

- 2 表示させたいデータに依存して:
 - ▶ *Relative Quantification* タブを開きます。
 - ▶ Resultsウィンドウエリアで、*Samples*, *Targets*, または *Analysis Results* タブを開きます。

結果の解析

Samples

Samples タブでは、サンプルとその色分けの表が表示されます。

Samples			
Color	Name	Note	Calibrator
	heart		
	kidney		
	liver		
	H2O		

☐ Graph selected samples only

Targets

Targets タブでは、実験で使われたターゲット、その色分け、関連する色素の表が表示されます。

SamplesTargetsAnalysis Results

Color	Name	Dye
	Target1	FAM
	Target2	FAM
	Reference1	FAM
	Reference2	FAM

☐ Graph selected targets only

Analysis Results

Analysis Results タブでは、相対定量の結果が、サンプルとターゲットの各組合せを 1 列にならべた表として表示されます。

Sample	Target	E Corr. Cq	ΔCq	Ratio	Ratio Min.	Ratio Max.	$\Delta\Delta Cq$	Norm. Ratio	N.R. Min.	N.R. Max.
heart	Target1	30.16 ± 0	4.86 ± 0	0.034	0.034	0.034	-0.05 ± 0.1	1.032	0.965	1.103
heart	Target2	30.6 ± 0.03	5.3 ± 0.03	0.025	0.025	0.026	0.9 ± 0.08	0.537	0.509	0.568
heart	Reference1	24.85 ± 0								
heart	Reference2	25.75 ± 0								
kidney	Target1	29.94 ± 0.16	4.39 ± 0.16	0.048	0.043	0.053	-0.51 ± 0.18	1.427	1.257	1.619
kidney	Target2	29.5 ± 0.01	3.95 ± 0.02	0.065	0.064	0.065	-0.45 ± 0.08	1.37	1.299	1.444
kidney	Reference1	26.26 ± 0.01								
kidney	Reference2	24.86 ± 0.01								
liver	Target1	30.88 ± 0.09	4.91 ± 0.1	0.033	0.031	0.036	0 ± 0.14	1	0.91	1.099
liver	Target2	30.38 ± 0.07	4.4 ± 0.07	0.047	0.045	0.05	0 ± 0.11	1	0.929	1.076

 Export...

4 High Resolution Melting

High Resolution Melting（高解像度融解）は、未知の変異や修飾のスクリーニングを目的としたPCR後の実験方法です。この手法では、すべてのメルティング解析と同じようにDNAサンプルを加熱し、DNAが2本鎖（dsDNA）から1本鎖（ssDNA）への解離の様子の詳細を記録します。High Resolution Melting は、dsDNAにのみ結合しDNAの結合容量を超えて存在する蛍光色素（例、ResoLight色素）の存在下で実施されます。この色素はssDNAとは相互作用しませんが、dsDNAの存在下では強力に蛍光を発します。このような蛍光の変化によりPCR中のDNA量の増幅の測定と、さらに高解像度融解中の加熱により誘導されるDNAの解離を直接測定することができます。

下記の例では、High Resolution Melting（高解像度融解）解析のセットアップと実行の方法を説明し、特定の一塩基多型（SNP）解析について野生型、ヘテロ接合型、またはホモ接合型サンプルのdifferent plot curve を作成します。

サンプル	MagNA Pure LC 2.0 Instrumentにより単離したヒトゲノムDNA3種（濃度は約90 ng/μl）
試薬	▶ LightCycler® 480 High Resolution Melting Master（1×濃度） ▶ Forwardプライマー：最終濃度400 nM ▶ Reverseプライマー：最終濃度400 nM

4.1 サンプルのセットアップ

サンプルをセットアップするにあたって、まずPCRミックスとサンプル希釈液を準備します。



セットアップの間、反応チューブは氷上に置き、サンプルとPCRミックスを冷却してください。

反応ミックス

下記の通り反応ミックスを準備します：

- ▶ 各ヒトゲノムDNA用として、20 μlを反応10回分。
- ▶ NTC（ネガティブコントロール）用として、20 μlを反応2回分。

試薬	μl/反応
H ₂ O	3.9
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master（1×濃度）	10
Forwardプライマー（10 μM）	0.8
Reverseプライマー（10 μM）	0.8
MgCl ₂ （25 mM）	2.0
ヒトゲノムDNA	2.5
反応ミックス（上記の混合液）	20

サンプルの希釈

ヒトゲノムDNA（濃度約90 ng/μl）を、一定の濃度20 ng/5 μlに希釈します。

ピペッティングスキーム

- 1 下記の図の通り、DNA反応ミックス20 µlを、LightCycler® 8-Tube Strips (clear)の各チューブへと分注します。
- 2 下記の図の通り、NTC20 µlを分注します。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2
Strip B	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3	NTC
Strip C	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3
Strip D	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	Sample2	Sample3	Sample1	NTC

遠心

- 1 ストリップのキャップを正しい位置にしっかりと押し付け、チューブを閉じます。
 完全に閉じられていることを確認してください。完全に閉じていなければランの間に中身が蒸発する恐れがあります。
- 2 安全に遠心するために、チューブストリップを標準の96穴MWPに設置します(17ページの「[遠心](#)」の項をご参照ください)。
- 3 MWPに入れたチューブを3,000 x gで最長30秒間遠心します。

B

4.2 実験のプログラミングと実行



実験のセットアップと実行の詳細については、18ページの「[実験のプログラミングと実行](#)」の項をご参照ください。

4.2.1 光学系の設定

1 新規のexperiment を作成します (18ページの「[実験の作成](#)」をご参照ください)。

2 *Run Settings* タブを開きます。

Optics Settings ウィンドウエリアにおいて:

- ▶ この実験ではResoLight色素を使用するため、*Intercalating Dyes*を選択します (74ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
- ▶ *Normal Quality* を選択して光学系の取得品質を設定します。
- ▶ *Optimize Melt Acquisitions* オプションにチェックを選択します。

The screenshot shows the 'Optics Settings' window. It contains the following text and options:

Please select the brightest dye present in any well.
If you are unsure, use the 'Intercalating Dyes' option.

☒ **Intercalating Dyes** (SYBR Green I, ResoLight) ← Red arrow

☐ **Hydrolysis Probes** (FAM, VIC, HEX, Yellow 555, Red 610, TexasRed, Cy5)

☐ **Other Dyes**

The instrument can increase signal quality by acquiring for longer on each cycle of amplification, after the hold is complete.
Please select desired signal quality - if you are unsure, use the 'Normal Quality' option.

☐ **High Quality**

☒ **Normal Quality** ← Red arrow

☐ **High Speed**

The instrument can automatically find the best settings to use during melting.
If this option is selected, the acquisition time will depend on dye intensity.
If the option is not selected, the same settings selected above will be used throughout the run.

☒ **Optimize Melt Acquisitions** ← Red arrow

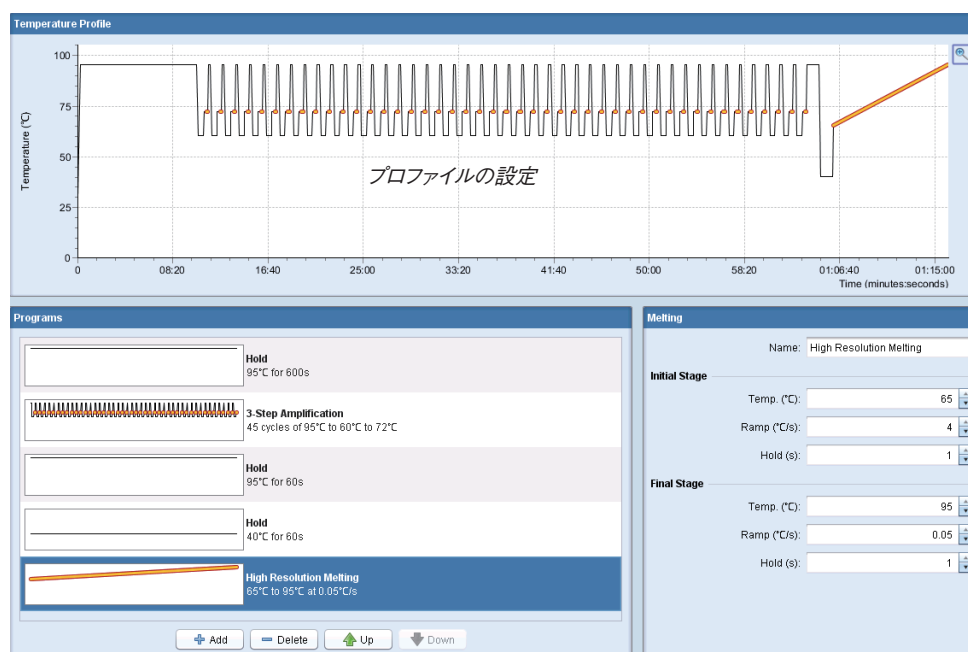
4.2.2 プロファイルの作成

この例では、下記の加熱と冷却のサイクルを使います:

Program		Temp (°C)	Ramp (°C/s)	Hold (s)	
Hold		95	4	600	
3-Step Amplification	45 Cycles	95	5	10	
		60	4	25	
		72	4	15	Acquire
Hold		95	4	60	
Hold		40	4	60	
High Resolution Melting	Initial Stage	65	4	1	
	Final Stage	95	0.05	1	

対応するプロファイルの設定

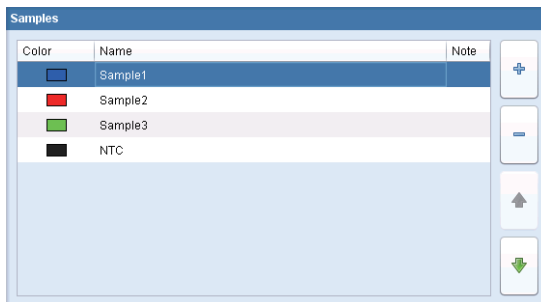
- 1 Profile タブを開きます。
- 2 Programs ウィンドウで、プログラムを追加し、上表のリストの通りプログラムを設定します (20 ページの「[プロファイルの設定](#)」をご参照ください)。
- 3 Temperature Profile で、設定した実験プロトコル全体をグラフで確認します。グラフで時間と温度サイクルを確認し、必要に応じてプログラムと設定温度を修正します。



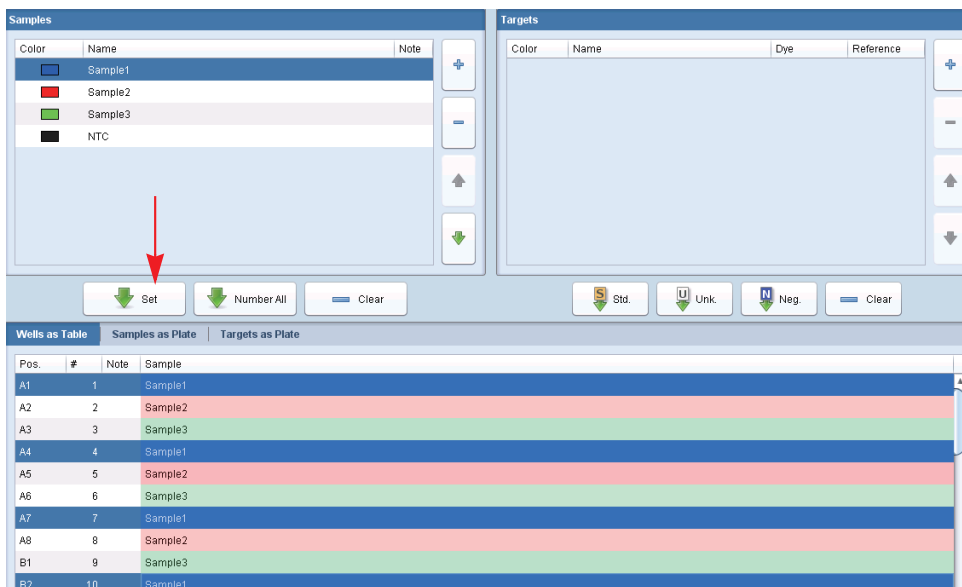
4.2.3 サンプルとターゲットの編集

サンプルの編集と割り当て

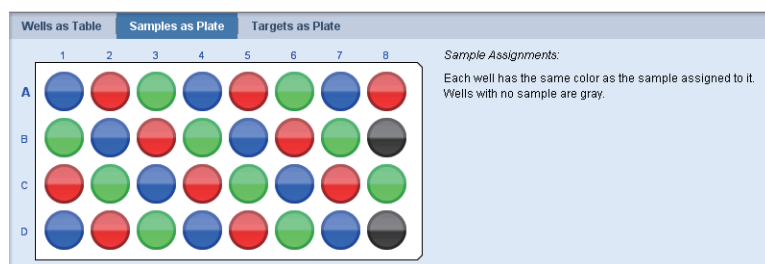
- 1 *Samples*タブを開きます。
- 2 *Samples* ウィンドウエリアで(画像)  をクリックし、解析に応じて4サンプル追加します (23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。この例では、下記のサンプル名を設定します:
 - ▶ *Sample1*、*Sample2*、*Sample3*: 未知のサンプル
 - ▶ *NTC*: ネガティブコントロール



- 3 サンプルをウェルに割り当てます (23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」をご参照ください):
 - ▶ *Sample1*を選択します。
 - ▶ *Wells as Table* タブまたは *Samples as Plate* タブにおいて、下記のウェルを選択します:
 - A1, A4, A7
 - B2, B5
 - C3, C6
 - D1, D4, D7
 - ▶ *Set* をクリックします。

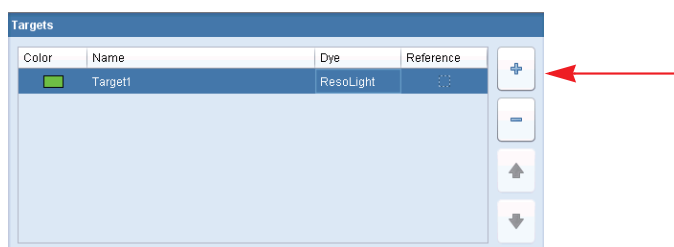


- 4 70ページの「[ピペッティングスキーム](#)」に従い、他のサンプルに対してもこれらのステップを繰り返します。
*Wells as Table*と*Samples as Plate*タブには、割り当てられたサンプルが表示されます:



ターゲットの編集と割り当て

- 1 *Targets* ウィンドウエリアで(画像)  をクリックし、新しいターゲットを追加します (25ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
- ▶ ターゲット名を変更します。
 - ▶ ターゲットに *ResoLight* 色素を割り当てます。

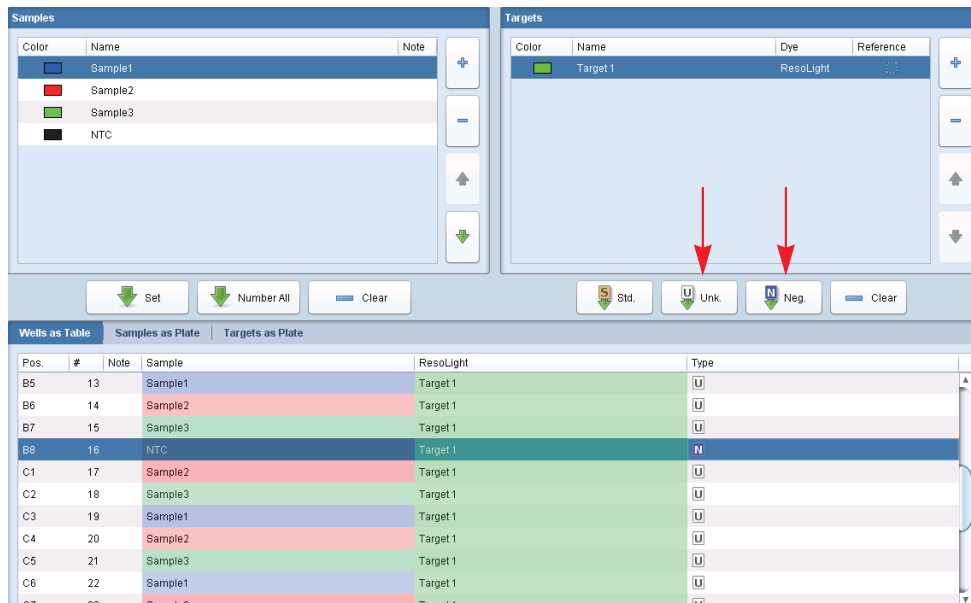


ターゲットをウェルに割り当てます:

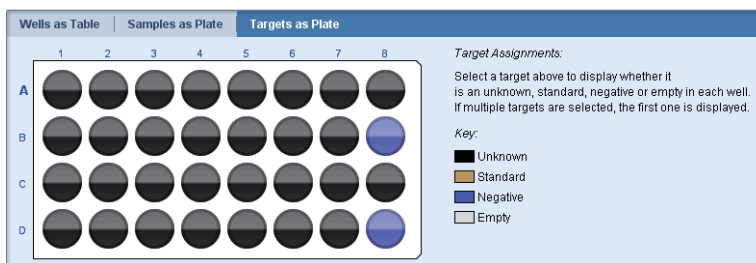
- 2
- ▶ ターゲットを選択します。
 - ▶ *Wells as Table*タブまたは*Targets as Plate*タブにおいて、B8とD8以外のすべてのウェルを選択します。
 - ▶ *Unk.* をクリックし、未知量のサンプルとして選択したウェルに追加します。



- 3 ネガティブコントロールを割り当てます:
- ▶ ターゲットを選択します。
 - ▶ ウェルB8とD8を選択します。
 - ▶ *Neg.* をクリックし、ネガティブコントロールとして選択したウェルに追加します。



*Wells as Table*タブと*Targets as Plate*タブには、対応するウェルに割り当てられたターゲットが表示されます:

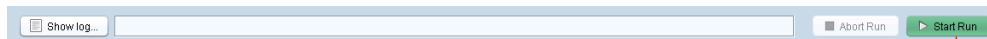


実験の保存

- 1 メインウィンドウのexperiment bar において:
- ▶ *Save*をクリックし、現在開いている実験を保存します。まだファイルがなければ、*Save*ダイアログボックスが開きます。
 - ▶ *Save As*をクリックし、実験を特定の場所に保存します。*Save As* ダイアログボックスが開きます。(27ページの「[実験の保存](#)」の項をご参照ください)。

4.2.4 実験の実行

- 1 LightCycler® Nano Instrumentにサンプルのチューブストリップを設置します。(28ページの「[ランの開始](#)」の項をご参照ください)。
- 2 ステータスバーのStart Runをクリックします。必要な場合、実験を保存するよう求められます。

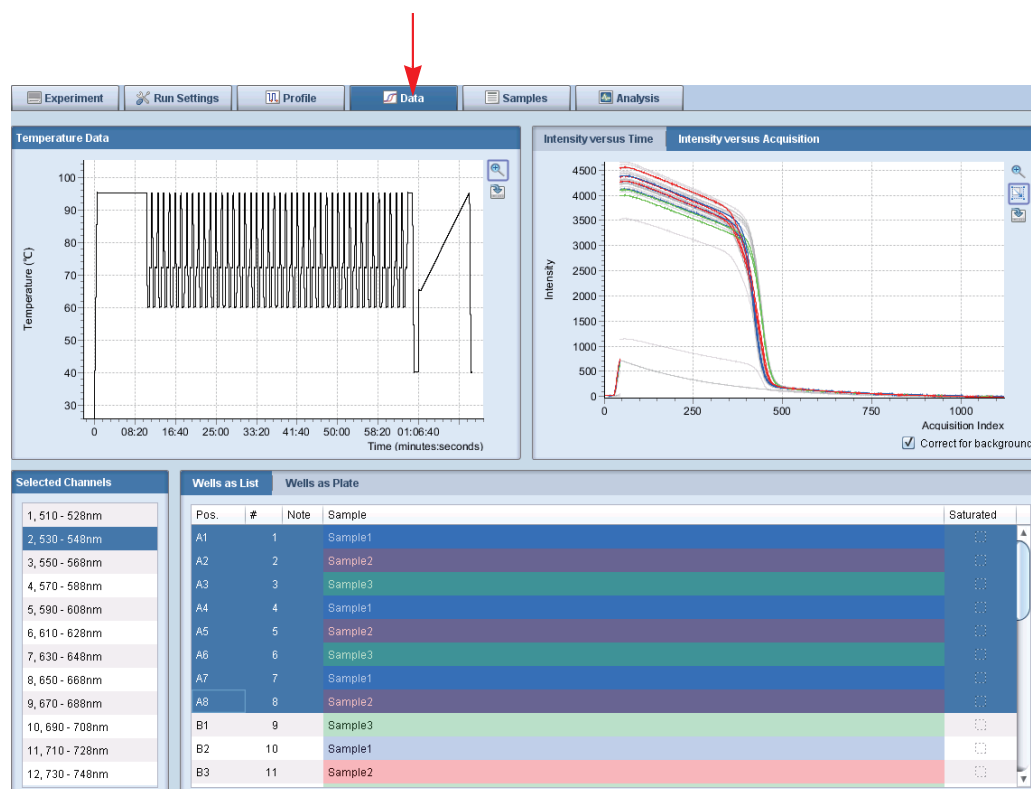


ステータスバーには現在のランの状況が表示されます。

- 3 Dataタブを開き、実行中の実験の進行状況を表示させます(29ページの「[ランのモニタリング](#)」の項をご参照ください)。



Data タブのグラフと表の詳細については、「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。



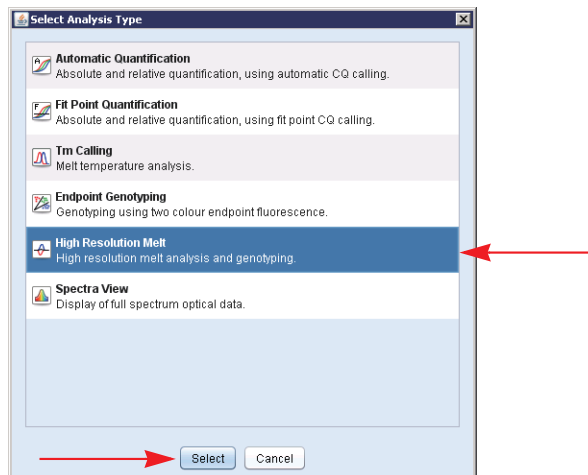
- 4 ResoLight色素を使用している場合は、Selected Channelsウィンドウエリアで530 - 548 nmを選択します。
- 5 Wells as ListタブまたはWells as Plateタブを使って、グラフのウィンドウに表示させるウェルを選択します。
- 6 グラフのウィンドウにおいて:
 - ▶ 表示させるサンプルを選択します。
 - ▶ Correct for backgroundオプションにチェックを入れます。
 - ▶ 曲線のツールチップを表示させ、情報を確認します。

4.3 解析方法の設定

算出結果を表示するために、高解像度融解解析を設定します。

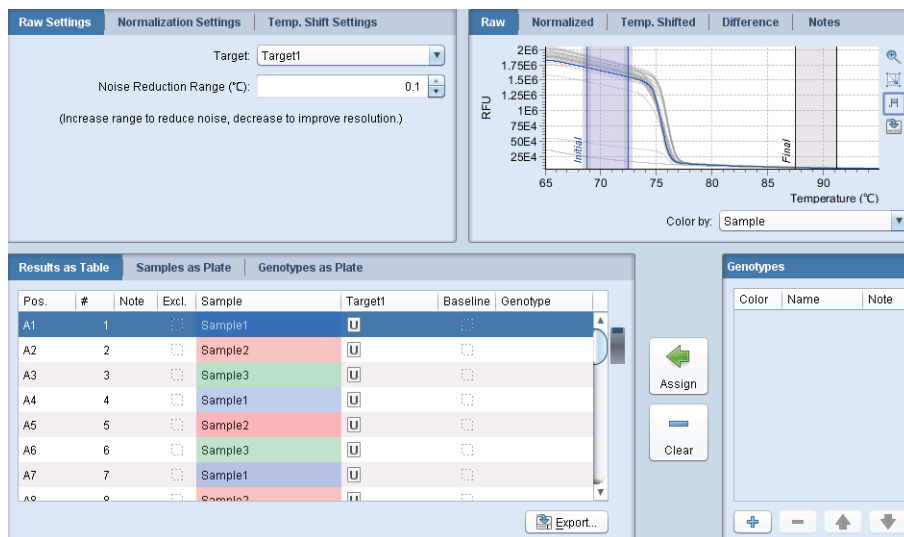
高解像度融解解析の設定

- 1 Analysisタブを開きます (30ページの「[自動定量法 \(Automatic Quantification method\) の設定](#)」の項をご参照ください)。
- 2 Select Analysis ウィンドウにて:
 - ▶ (画像)  をクリックし、新しい解析を追加します。Select Analysis Typeダイアログが開きます。
 - ▶ High Resolution Meltを選択し、Selectをクリックします。



Analysisタブが表示され、Raw SettingsとRawタブにデフォルト値が表示されます。

- 3 Raw Settingsタブにおいて、解析するターゲットを選択します。Samplesタブにおける設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。



- 4 陰性サンプルや蛍光強度の低いサンプルを計算から除外します。

- ▶ *Results as Table* タブを開きます。
- ▶ *Excl.* のカラムで、対象のサンプルを選択します。

Results as Table							
				Samples as Plate	Genotypes as Plate		
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	Target1	Baseline	Genotype
D1	25			Sample1	U		
D2	26			Sample2	U		
D3	27			Sample3	U		
D4	28			Sample1	U		
D5	29			Sample2	U		
D6	30			Sample3	U		
D7	31			Sample1	U		
D8	32			NTC	N		

- 5 *Raw Settings* タブにおいて:

- ▶ 解析するターゲットを選択します。
- ▶ *Noise Reduction Range* を指定します。この例ではデフォルト値を使います。

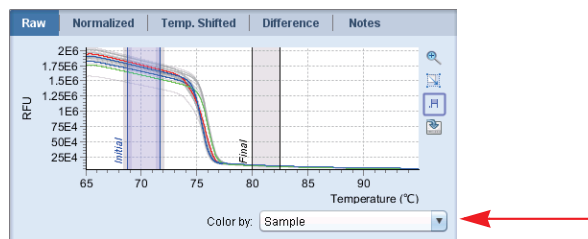
Raw Settings Normalization Settings Temp. Shift Settings

Target: Target1

Noise Reduction Range (°C): 0.1

(Increase range to reduce noise, decrease to improve resolution.)

- 6 グラフのウィンドウにおいて、曲線の色分けについて *by sample* (サンプルごと) または *by genotype* (遺伝子型ごと) を選択します。

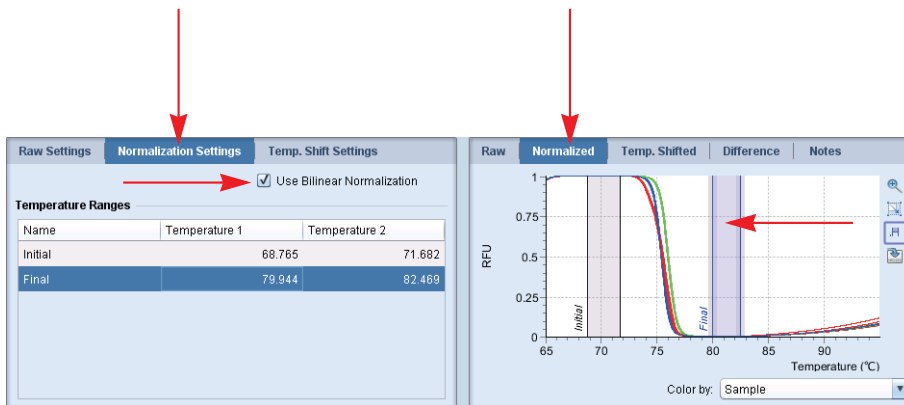


7 Normalization Settingsタブと Normalizedタブを開きます。

- ▶ Use Bilinear Normalizationオプションを選択し、温度に対する蛍光強度曲線の直線回帰を行います。
- ▶ Normalized タブにおいて Initial (初期蛍光強度)と Final (最終蛍光強度) スライダーを使って、標準化に最適であると期待される温度範囲の位置を決めます。

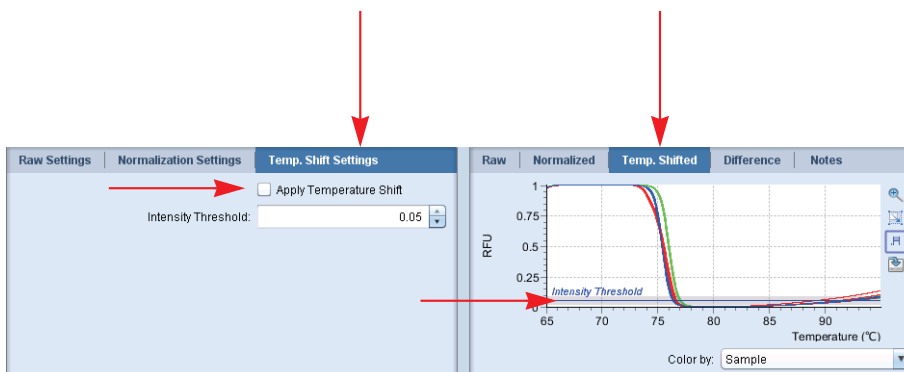


正規化の温度範囲は、蛍光強度推移領域の上下約3°Cの位置に配置させ、範囲幅は約2°Cに設定します。



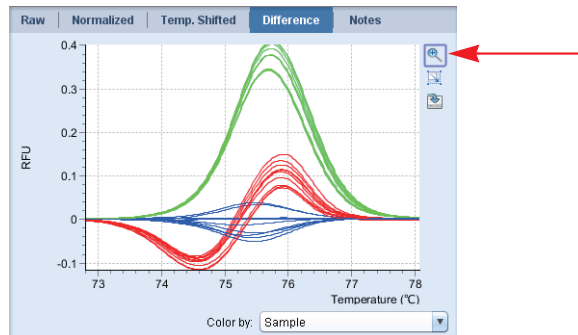
8 温度パフォーマンスが良好ではない場合のオプション: Temp. Shift SettingsタブとTemp. Shiftedタブを開きます。

- ▶ Apply Temperature Shift オプションにチェックを入れます。
- ▶ Temp. Shifted タブの Intensity Threshold スライダーを使い、蛍光強度の閾値を設定します。



- 9 Differenceタブを開き、標準化と温度シフトの後にベースライン曲線を引き算することで現れる各曲線を表示させます。

(画像)  をクリックしてズーム機能を使い、グラフの関連部分を表示させます。



グラフの曲線の見え方は *Results as Table* タブにおいてリファレンスとして選択したベースラインに依存します。ベースラインを変更するには、使用するサンプルの *Baseline* のコラムにチェックを入れます。

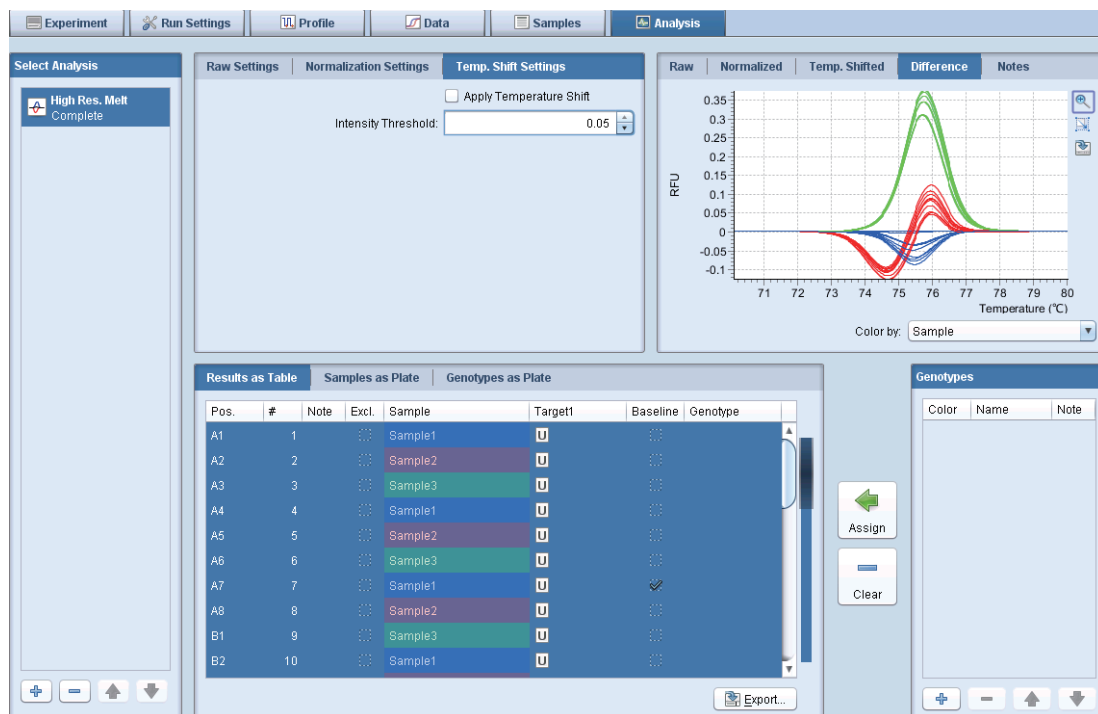
Results as Table						
Samples as Plate						
Genotypes as Plate						
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	Target1	Baseline
A6	6			Sample3	U	
A7	7			Sample1	U	☒
A8	8			Sample2	U	
B1	9			Sample3	U	
B2	10			Sample1	U	
B3	11			Sample2	U	
B4	12			Sample3	U	
B5	13			Sample1	U	
B6	14			Sample2	U	

 ベースラインを選択していない場合、ウェル「#1」がベースラインとして使われ、「Notes」タブに次の警告が表示されます。

[High Res. Melt
No baseline well selected, using well no. 1 instead.]

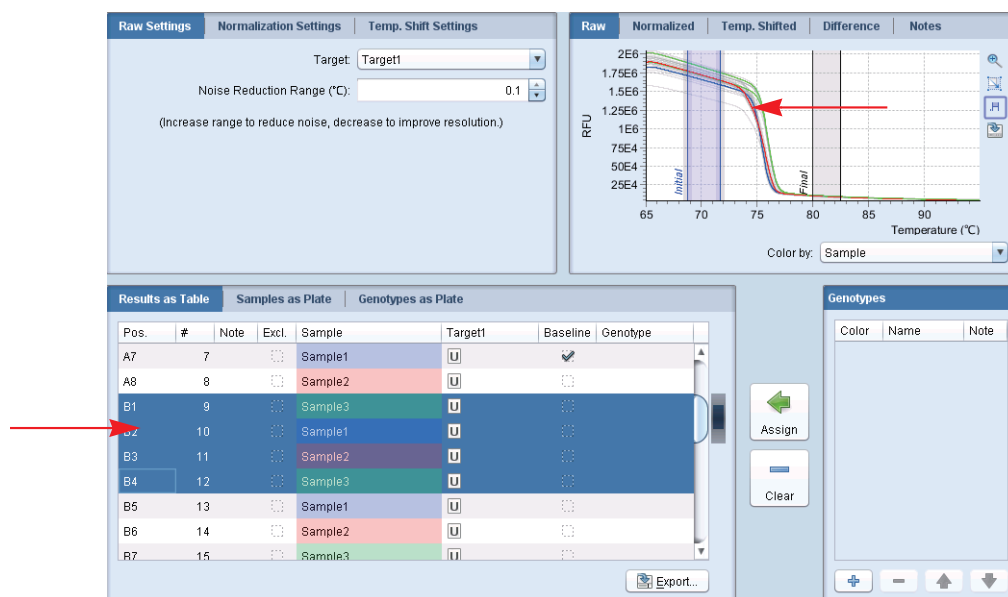
4.4 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、Analysisタブで結果を確認し、遺伝子型グループを割り当てます。



1

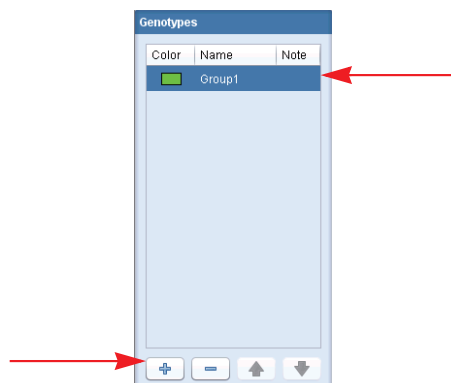
表示させるサンプルを選択します。グラフのウィンドウにおいて選択されている曲線は、常にresultsウィンドウで選択しているサンプルに対応しています:



キーボードの[Ctrl]と[a]キーを使って Results as Table タブのすべてのサンプルを選択します。

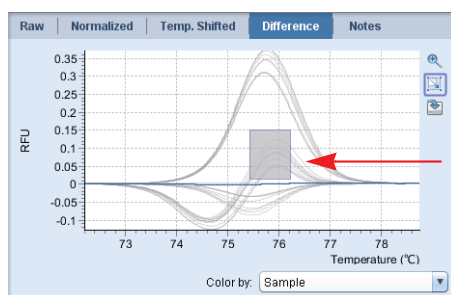
2 遺伝子型を作成し、ウェルに割り当てます:

- ▶ *Genotypes* ウィンドウにおいて、(画像)  をクリックして新しい遺伝子型を追加します。
- ▶ 遺伝子型の名前を編集します。
- ▶ 各遺伝子型の色を選択します。



3 手動で作成した遺伝子型を、サンプルの difference plot curve の形状プロファイルに基づき選択したウェルに割り当てます。

- ▶ その遺伝子型を割り当てるサンプルを選択します。例えば、*Difference* タブのグラフの中の (画像)  をクリックし、マウスの左ボタンを使って四角を描きます。マウスボタンを離すと、その四角を通るすべての曲線が選択されます。



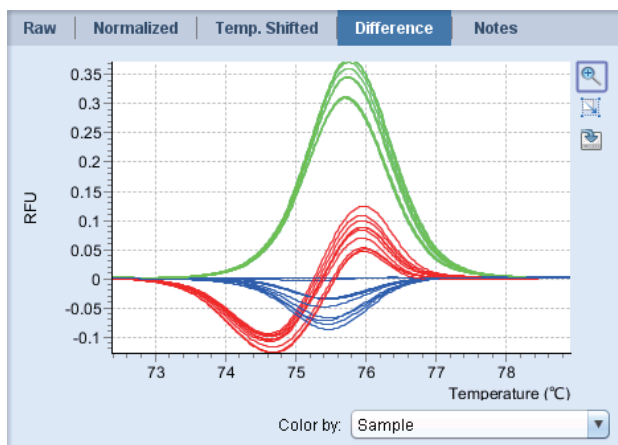
- ▶ 遺伝子型を選択します。
- ▶ *Assign* をクリックします。

The screenshot shows the software interface with the *Assign* button highlighted. The *Genotypes* window on the right shows three groups: Group1 (green), Group2 (blue), and Group3 (purple). The *Results as Table* section shows a table with columns Pos., #, Note, Excl., Sample, Target1, Baseline, and Genotype. The *Samples as Plate* section shows a grid of wells with sample names. The *Genotypes as Plate* section shows a grid of wells with genotype names. The *Raw Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings. The *Normalization Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings. The *Temp. Shift Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings. The *Results as Table* section shows a table with columns Pos., #, Note, Excl., Sample, Target1, Baseline, and Genotype. The *Samples as Plate* section shows a grid of wells with sample names. The *Genotypes as Plate* section shows a grid of wells with genotype names. The *Raw Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings. The *Normalization Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings. The *Temp. Shift Settings* section shows Target1 and Noise Reduction Range (°C) settings.

- 4 resultsウィンドウエリアでは、見たいデータによって、*Results as Table* タブ、*Samples as Plate* タブ、または *Genotypes as Plate* タブを開きます。

Difference／Results as Table

Differences タブと *Results as Table* タブには、3つのグループのレプリケートサンプルが表示されます。例えば、そのグループは、野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型のサンプルにグループ分けされます。

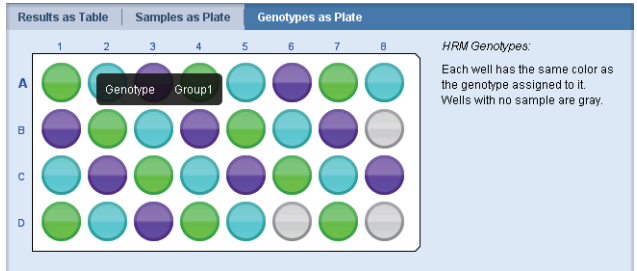


Results as Table		Samples as Plate		Genotypes as Plate			
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	Target1	Baseline	Genotype
A1	1		☐	Sample1	☐	☐	Group1
A2	2		☐	Sample2	☐	☐	Group2
A3	3		☐	Sample3	☐	☐	Group3
A4	4		☐	Sample1	☐	☐	Group1
A5	5		☐	Sample2	☐	☐	Group2
A6	6		☐	Sample3	☐	☐	Group3
A7	7		☐	Sample1	☐	☒	Group1
A8	8		☐	Sample2	☐	☐	Group2
B1	9		☐	Sample3	☐	☐	Group3
B2	10		☐	Sample1	☐	☐	Group1
B3	11		☐	Sample2	☐	☐	Group2

 Export...

Genotypes as Plate

Genotypes as Plate タブには、割り当てられた遺伝子型が *Genotypes* ウィンドウの色の特性により色分けされて表示されます (81ページの「[結果の解析](#)」の項のステップ3をご参照ください)。ウェル上にカーソルを配置させ、遺伝子型の名前のツールチップを表示させます。



5 エンドポイントジェノタイピング

エンドポイントジェノタイピングアッセイでは、ターゲットDNAの野生型および変異型に個別にデザインされ、別々の色素で標識した2種類の配列特異的プローブを使用します。本ソフトウェアは、この2種類の色素のPCR後の強度分布を測定することにより遺伝子型を決定します。エンドポイントジェノタイピングアッセイでは加水分解プローブを用います。各プローブには蛍光レポーター色素とクエンチャーの2種類の標識を含み、これらは互いに近接しています。

下記の例では、特異的な一塩基多型 (SNP) 解析において野生型、ヘテロ接合型、ホモ接合型サンプルの異なるエンドポイント蛍光値を測定するエンドポイントジェノタイピングアッセイのセットアップと実行の方法を説明します。

サンプル	MagNA Pure LC 2.0 Instrumentで単離したヒトゲノムDNA3種(濃度約90 ng/μl)
試薬	▶ FastStart Essential DNA Probes Master (2×濃度) ▶ Primer hydrolysis probes mix (40×濃度)、forwardプライマー、reverseプライマー、2種類の加水分解プローブ (FAM, VIC 等の別々の色素で標識、1つは野生型相補的、1つは変異型相補的) を含む

5.1 サンプルのセットアップ

サンプルをセットアップするにあたって、まずPCRミックスとサンプル希釈液を準備します。



セットアップの間、反応チューブは氷上に置き、サンプルとPCRミックスを冷却してください。

反応ミックス

下記の通り反応ミックスを準備します:

- ▶ 各ヒトゲノムDNA用として、それぞれ20 μlを10反応分。
- ▶ NTC用として、20 μlを2反応分。

試薬	μl/反応
H ₂ O	7
FastStart Essential DNA Green Master (2×濃度)	10
Primer hydrolysis probes mix (40×濃度)	0.5
ヒトゲノムDNA	2.5
反応ミックス(上記の混合液)	20

サンプルの希釈

ヒトゲノムDNA (濃度約90 ng/μl) を、一定の濃度20 ng/5 μlに希釈します。

ピペッティングスキーム

- 1 下記の図の通り、各DNA反応ミックス20 µlをLightCycler® 8-Tube Strips (clear)の各チューブへと分注します。
- 2 下記の図の通り、NTC(ネガティブコントロール)20 µlを分注します。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Strip A	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2
Strip B	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3	NTC
Strip C	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3
Strip D	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	DNA2	DNA3	DNA1	NTC

遠心

- 1 ストリップのキャップを正しい位置にしっかりと押し付け、チューブを閉じます。
 完全に閉じられていることを確認してください。完全に閉じていなければランの間に中身が蒸発する恐れがあります。
- 2 安全に遠心するために、チューブストリップを標準の96穴MWPに設置します(17ページの「[遠心](#)」の項をご参照ください)。
- 3 MWPに入れたチューブを3,000 x gで最長30秒間遠心します。

5.2 実験のプログラミングと実行



実験のセットアップと実行の方法の詳細については、18ページの「[実験のプログラミングと実行](#)」の項をご参照ください。

5.2.1 光学系の設定

- 1 新規の実験を作成します (18ページの「[実験の作成](#)」の項をご参照ください)。
- 2 *Run Settings* タブを開きます。

Optics Settings ウィンドウにおいて:

- ▶ この実験ではFAM色素とVIC色素を使用するため、*Hydrolysis Probes* (加水分解プローブ) を選択します (62ページの「[ターゲットの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。
- ▶ *Normal Quality* を選択して光学系の取得品質を設定します。

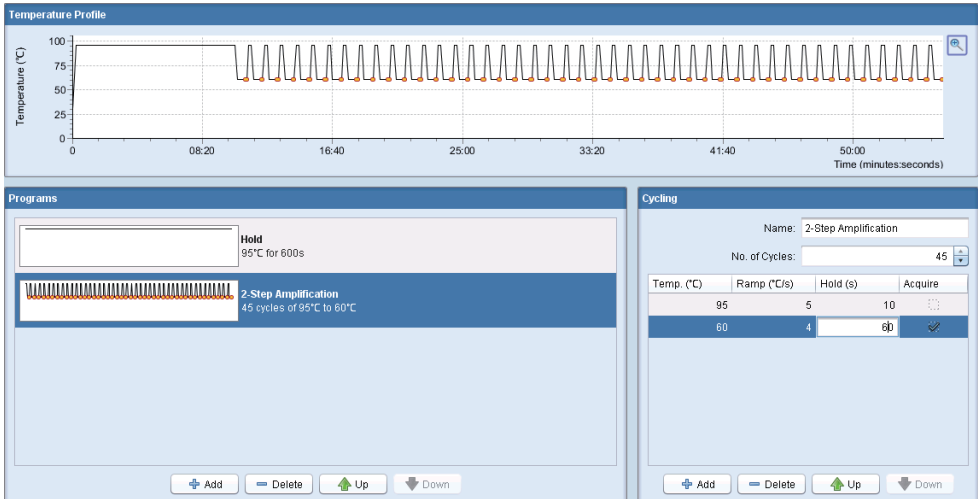
5.2.2 プロファイルの作成

この例では、下記の加熱と冷却のサイクルを使います:

Program		Temp (°C)	Ramp (°C/s)	Hold (s)	
Hold		95	4	600	
2-Step Amplification	45 Cycles	95	5	10	
		60	4	60	Acquire

対応するプロファイルの設定

- 1 Profile タブを開きます。
- 2 Programsウィンドウにおいて、プログラムを追加し、上表のリストの通りプログラムを設定します (20 ページの「[プロファイルの作成](#)」をご参照ください)。
- 3 Temperature Profile で設定した実験プロトコル全体をグラフで確認します。グラフで時間と温度サイクルを確認し、必要に応じてプログラムと設定温度を修正します。



5.2.3 サンプルとターゲットの編集

サンプルの編集と割り当て

1 Samplesタブを開きます。

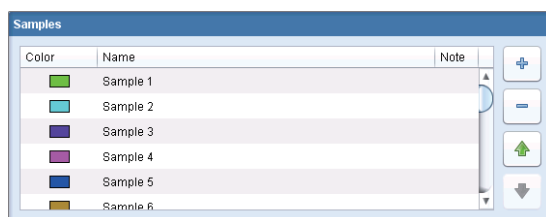
2 Samples ウィンドウエリアにおいて(画像)  をクリックし、解析に応じてサンプルを追加します(23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」の項をご参照ください)。



エンドポイントジェノタイピング実験でテクニカルレプリケートを行うときは、スキャタープロットでは各グループのレプリケートの平均値(単一のポイントとして)を表示します。各サンプルを単一のポイントとして表示させるには、各ウェルに対して異なるサンプル名を使用します。

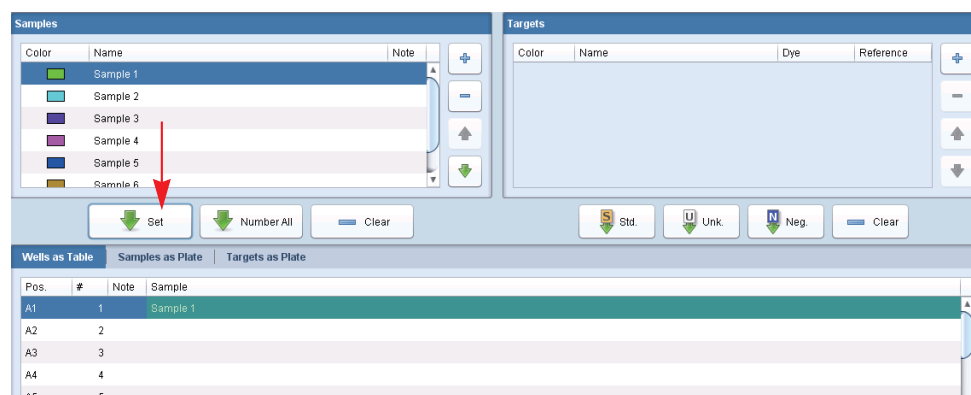
この例では、下記のサンプル名を使用します:

- ▶ 未知のサンプルに対しては *Sample1* ~ *Sample30*
- ▶ ネガティブコントロールに対しては *NTC1* と *NTC2*



3 サンプルをウェルに割り当てます(23ページの「[サンプルの編集と割り当て](#)」をご参照ください):

- ▶ *Sample1* を選択します。
- ▶ *Wells as Table* タブまたは *Samples as Plate* において、ウェルA1を選択します。
- ▶ *Set(設定)* をクリックします。

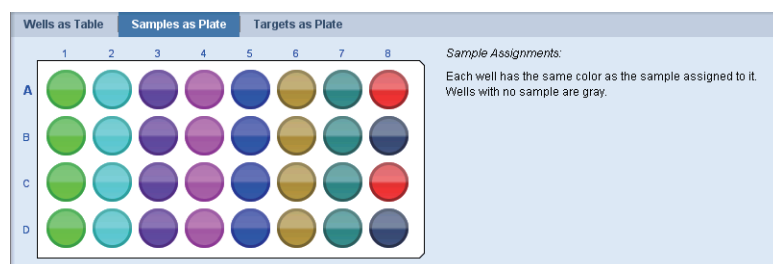


4 70ページの「[ピペッティングスキーム](#)」に従い、他のサンプルに対しても上記のステップを繰り返します。



または、1度にすべてのサンプルを追加し割り当てる場合は「*Number All*」機能を使います。

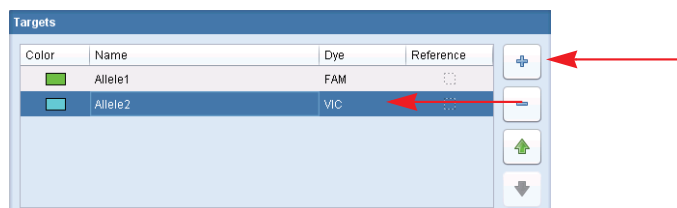
こうして *Wells as Table* と *Samples as Plate* タブには、割り当てられたサンプルが表示されます:



ターゲットの編集と割り当て

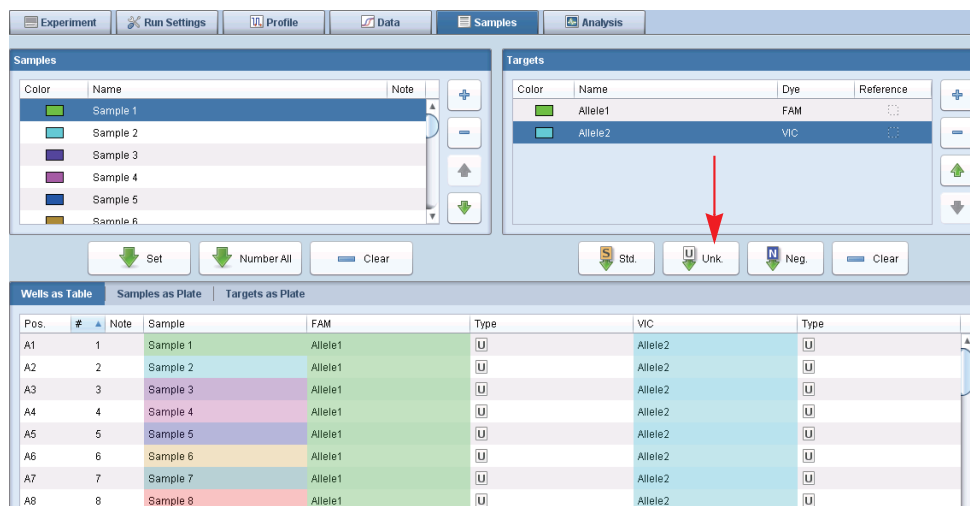
1 Targets ウィンドウエリアで(画像)  をクリックし、2つの新しいターゲットを追加します (25ページの「ターゲットの編集と割り当て」の項をご参照ください)。

- ▶ 必要に応じてターゲット名を変更します。この例では、*Allele1* と *Allele2* を使います。
- ▶ *Allele1* ターゲット に FAM dye を割り当てます。*Allele2* ターゲットに VIC dye を割り当てます。



2 ターゲットをウェルに割り当てます:

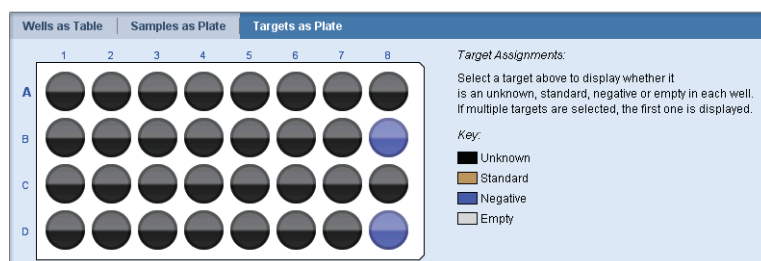
- ▶ *Allele1* を選択します。
- ▶ *Wells as Table* タブと *Targets as Plate* タブにおいて B8 と D8 以外のウェルすべてを選択します。
- ▶ *Unk* をクリックし、その未知量サンプルとして選択したウェルに追加します。
- ▶ *Allele2* に対しても、このステップを繰り返します。



3 ネガティブコントロールを割り当てます。

- ▶ ターゲットを選択します。
- ▶ ウェル B8 と D8 を選択します。
- ▶ *Neg* をクリックして、そのターゲットをネガティブコントロールとして選択したウェルに追加します。

Wells as Table タブと *Targets as Plate* タブには、対応するウェルに割り当てられたターゲットが表示されます:



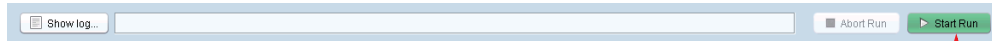
実験の保存

- 1 メインウィンドウのexperiment bar において:
 - ▶ Save をクリックし、現在開いている実験を保存します。まだファイルがなければ、Save ダイアログボックスが開きます。
 - ▶ Save As をクリックし、実験を特定の場所に保存します。Save As ダイアログボックスが開きます。(27ページの「[実験の保存](#)」の項をご参照ください)。

B

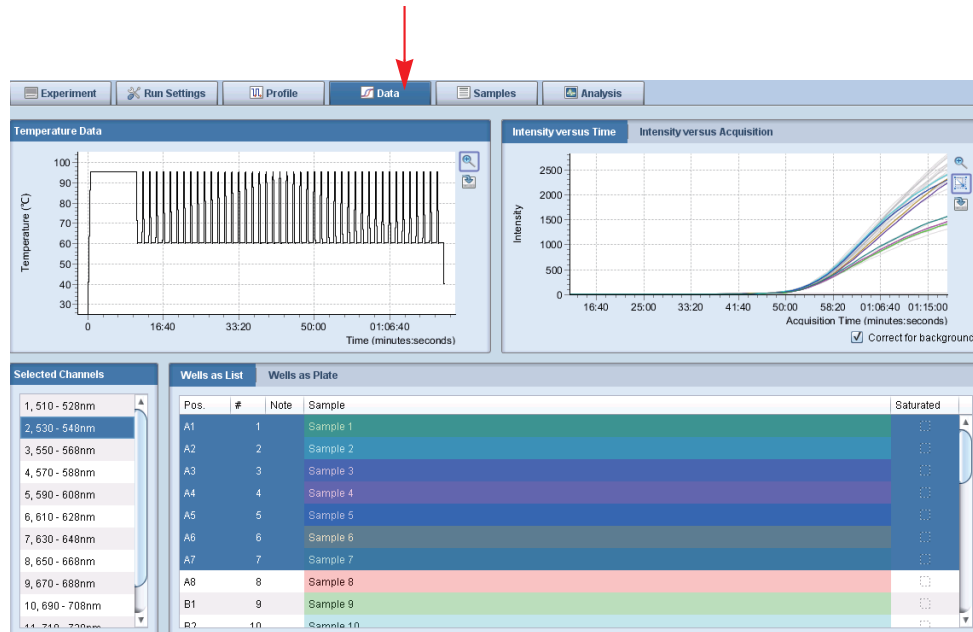
5.2.4 実験の実行

- 1 LightCycler® Nano Instrumentにサンプルのチューブストリップを設置します (28ページの「[実験の実行](#)」の項をご参照ください)。
- 2 ステータスバーの *Start Run* をクリックします。必要な場合、実験を保存するよう求められます。



ステータスバーには現在のランの状況が表示されます。

- 3 *Data* タブを開き、実行中の実験の進行状況を表示させます (29ページの「[ランのモニタリング](#)」の項をご参照ください)。
 *Data* タブのグラフと表の詳細については、「*LightCycler® Nano Instrument*オペレーターズガイド」の「ソフトウェア」の章をご参照ください。



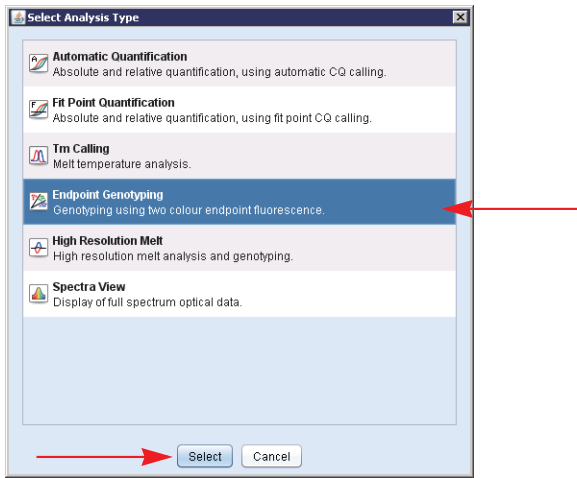
- 4 *Selected Channels* ウィンドウにおいて、該当する仮想チャンネルを選択します:
 - ▶ FAM色素データの場合は、530 - 548 nmを選択します。
 - ▶ VIC色素データの場合は、550 - 560 nmを選択します。
- 5 *Wells as List* タブまたは *Wells as Plate* タブを使って、グラフのウィンドウに表示させるウェルを選択します。
- 6 グラフのウィンドウにおいて:
 - ▶ 表示させるサンプルを選択します。
 - ▶ *Correct for background* オプションを選択します。
 - ▶ 曲線のツールチップを表示させ、情報を確認します。

5.3 解析方法の設定

算出結果を表示するために、エンドポイントジェノタイピングアッセイを設定します。

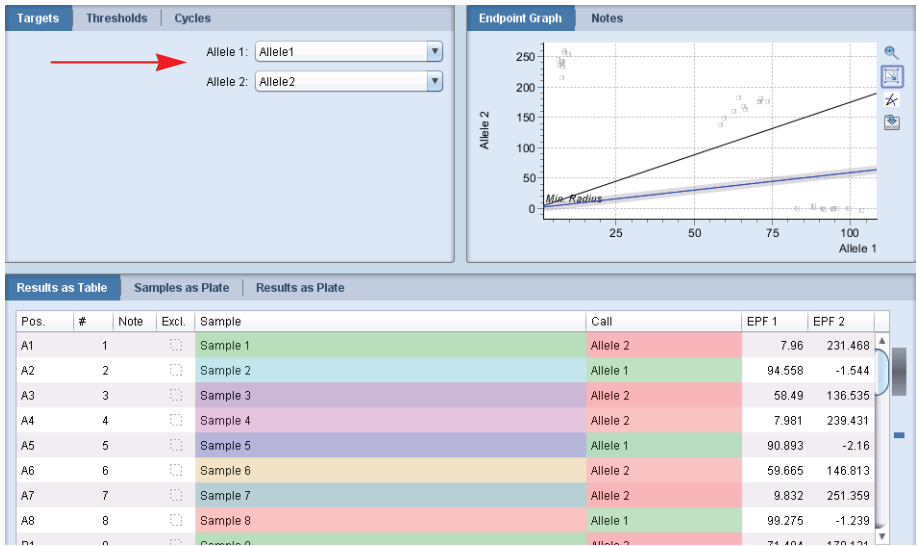
エンドポイントジェノタイピングアッセイの設定

- 1
- Analysis タブを開きます (30ページの「[自動定量法 \(Automatic Quantification method\) の設定](#)」の項をご参照ください)。
- 2
- Select Analysisウィンドウにおいて:
 - ▶ (画像)  をクリックし、新しい解析を追加します。Select Analysis Type ダイアログが開きます。
 - ▶ Endpoint Genotypingを選択し、Selectをクリックします。



Analysisタブが表示され、TargetsタブとEndpoint Graphタブにデフォルト値が表示されます。

- 3
- Targetsタブにおいて、解析したいターゲットを選択します。Samplesタブにおける設定に従って算出されたデータ結果が表示されます。

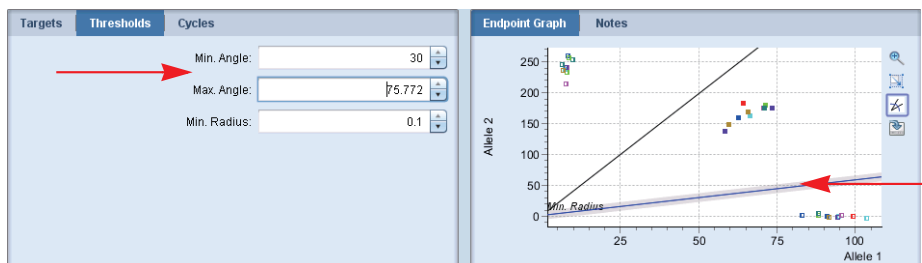


- 4 ThresholdsタブとEndpoint Graphタブを開きます。
- ▶ Endpoint Graphタブの(画像)  をクリックし、閾値により分けられる異なる遺伝子型を決めるスライダーの位置を設定します。

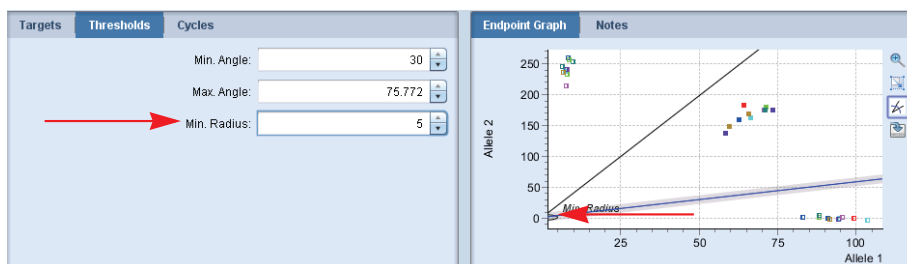


2つの角度スライダーの間のサンプルの値はAllele 1 と Allele 2 のヘテロとして分類されます。

Thresholdsタブの設定値は、Endpoint Graphタブのスライダーの位置に対応しています。



- 5 NTCサンプルを増幅なし(no amplification: NA)として分類するために、半径の位置を決めます。例えば、ThresholdsタブにおいてMin. Radius値を設定します。グラフの座標原点からこの半径内にあるポイントはNAとして分類されます。

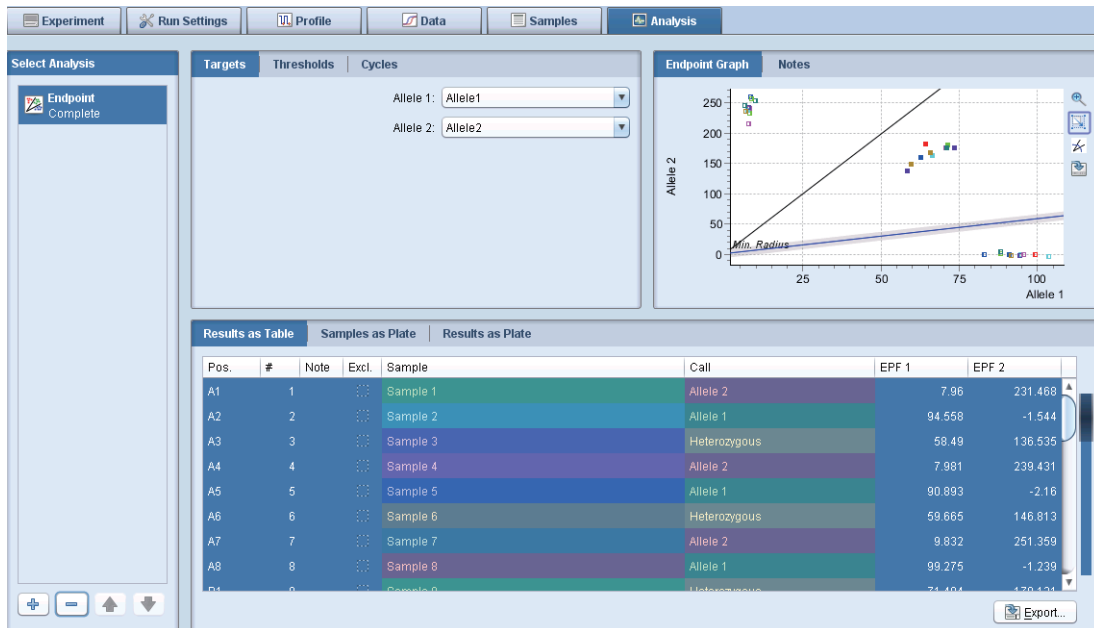


- 6 Cyclesタブにおいて、ターゲットのエンドポイント値を算出するために使われる増幅サイクルを設定します:

この例では、デフォルト値を使用します。

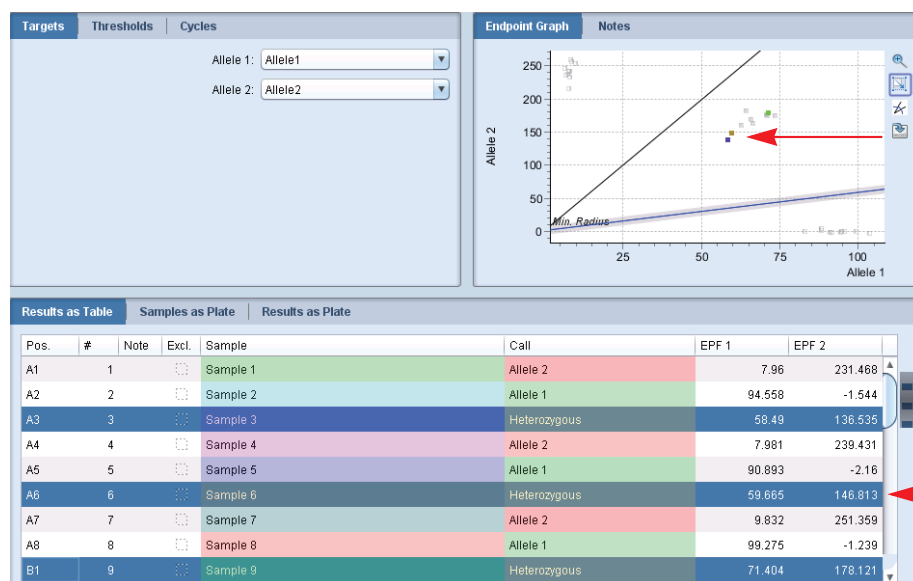
5.4 結果の解析

解析方法のすべてのパラメータを設定した後、*Analysis* タブにより結果を表示させます。



- 1 表示させるサンプルを選択します。例えば、*Endpoint Graph* 中の (画像)  をクリックし、マウスの左ボタンで四角を描きます。マウスのボタンを離すと、四角を通るすべてのサンプルが選択されます。

Endpoint Graph タブで選択されるサンプルは、*Results as Table* タブで選択するサンプルに対応しています。



- 2 キーボードの [Ctrl] と [a] キーを使って「*Results as Table*」タブのすべてのサンプルを選択します。

- 2 *Results as Table* タブでは、見たいデータによって、*Results as Table* (表で見る結果) タブ、*Samples as Plate* (プレートで見るサンプル) タブ、または *Results as Plate* (プレートで見る結果) タブを開きます。

Results as Table

Results as Tableタブには各解析サンプルに対する遺伝子型の Call が表示されます:

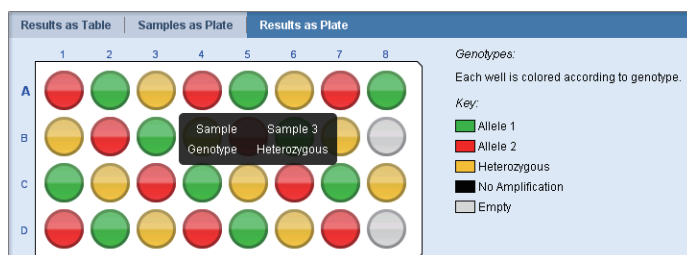
- ▶ Allele1ターゲットにのみ増幅を示すサンプルはAllele 1
- ▶ Allele2ターゲットにのみ増幅を示すサンプルはAllele 2
- ▶ 両方のターゲットに増幅を示すサンプルはHeterozygous

Results as Table タブには、ターゲットのエンドポイント蛍光値 (EPF) の実測値も表示されます。

Results as Table							
Pos.	#	Note	Excl.	Sample	Call	EPF 1	EPF 2
A1	1			Sample 1	Allele 2	7.96	231.468
A2	2			Sample 2	Allele 1	94.558	-1.544
A3	3			Sample 3	Heterozygous	58.49	136.535
A4	4			Sample 4	Allele 2	7.981	239.431
A5	5			Sample 5	Allele 1	90.893	-2.16
A6	6			Sample 6	Heterozygous	59.665	146.813
A7	7			Sample 7	Allele 2	9.832	251.359
A8	8			Sample 8	Allele 1	99.275	-1.239
B1	9			Sample 9	Heterozygous	71.404	178.121
B2	10			Sample 10	Allele 2	7.258	235.735
B3	11			Sample 11	Allele 1	94.259	-2.96

Results as Plate

Results as Plateタブには各ウェルで判定された遺伝子型が、Results as Tableタブにあるものと同じコードで色づけされて表示されます。カーソルを1つのウェル上に持ってくると、サンプル名と遺伝子型の判定のツールチップが表示されます。



システムのシャットダウン

システムのシャットダウンは下記のステップで行います:

- ▶ LightCycler® Nano Softwareの終了: 下記をご参照ください。
- ▶ ACアダプタをコンセントから抜く、またはLightCycler® Nano Instrumentから抜きます。
- ▶ LightCycler® Nano Instrumentを適切にクリーニングし、汚染を除去します (「LightCycler® Nano Instrumentオペレーターズガイド」の「クリーニングとお手入れ」の項をご参照ください)。

ソフトウェアのシャットダウン

-
- 1 必要なデータはすべて保存されていることを確認します。
 - 2 メインウィンドウの title bar にある(画像)  をクリックします。
 - 3 コンピュータをシャットダウンします。
-





別表

1 インデックス

A

Absolute Quantification タブ	31, 43, 65
Amplification タブ	
Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	50
自動定量 (Automatic Quantification) ..	33, 45, 51
Analysis Results タブ	
相対定量	67
Analysis タブ	
high resolution melting	77, 81
T _m calling	53, 55
エンドポイントジェノタイピング	93, 95
絶対定量	30, 33, 43, 45, 48, 51
相対定量	65, 67

C

Cq	7
Cq Values as Plate タブ	
profile	20, 38, 60, 72, 88
実験の作成	18
絶対定量	34, 47, 52
Cy5	7
Cycles タブ	
エンドポイントジェノタイピング	94

D

Data タブ	29, 42, 64, 76, 92
Difference タブ	
high resolution melting	80

E

E	7
Endpoint Graph タブ	
エンドポイントジェノタイピング	94
EPF	7
Experiment Summary	18
実験 (ラン) 作成	18
実行	28, 42, 64, 76, 92
保存	27, 41, 63, 75, 91
モニタリング	29, 42, 64, 76, 92
Experiment タブ	18

F

FAM	7
Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	48
Amplification タブ	50
Quantifiers タブ	50
Settings タブ	49

G

Genotypes as Plate タブ	
high resolution melting	84

Genotypes ウィンドウエリア	
high resolution melting	82
GOI	7

H

HEX	7
High resolution melting (高解像度融解)	69, 77
Analysis タブ	81
Data タブ	76
Difference タブ	80
Genotypes as Plate タブ	84
High Resolution Melt analysis (高解像度融解解析)	77
Normalization Settings タブ	79
PCR ミックス	69
Profile タブ	72
Raw Settings タブ	77, 78
Raw タブ	77
Results as Table タブ	83
Run Settings タブ	71
Samples タブ	73
Temp. Shift Settings タブ	79
遺伝子型の作成	82
サンプルのセットアップ	69
サンプルの編集	73
ターゲットの編集	74
生データ	76
HRM	7

L

LAN	7
LED	7
LightCycler® Nano Instrument	
記号	8
起動	11
シャットダウン	97
パワーオンセルフテスト	11
ベースプレート	9
LightCycler® Nano ソフトウェア	
Mac OS X での起動	13
Microsoft Windows での起動	12
シャットダウン	97

M

Melt Curve タブ	
T _m calling	54
Melt curves	54
Melt Peaks タブ	
T _m calling	54
Microsoft Windows 上での	
LightCycler® Nano Software	12
MWP	7

N

Normalization	79
Normalization Settings タブ	
high resolution melting	79
NTC	7

P

PCR	7
PCR のダイナミックレンジ	16
PCR ミックス	
high resolution melting	69
エンドポイントジェノタイピング	85
絶対定量	16, 35
相対定量	57
PE	7
Peak areas	54
Peak Areas タブ	
T _m calling	54
Profile タブ	20, 38, 60, 72, 88

Q

qPCR	7
Quantifiers タブ	
Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	50
絶対定量	32, 44
相対定量	66

R

Raw Settings タブ	
high resolution melting	77, 78
Raw タブ	
high resolution melting	77
Relative Quantification タブ	66
Results as Plate タブ	
エンドポイントジェノタイピング	96
Results as Table タブ	
high resolution melting	83
T _m calling	55
エンドポイントジェノタイピング	96
絶対定量	33, 46, 51
RFU	7
開始	28, 42, 64, 76, 92
セッティング	19, 37, 59, 71, 87
必要な条件	15
モニタリング	29, 42, 64, 76, 92
ラン (実験) 終了	29
Run Settings タブ	19, 37, 59, 71, 87

S

Samples タブ	23
high resolution melting	73
エンドポイントジェノタイピング	89
絶対定量	23, 39
相対定量	61, 66
SD	7

Settings タブ

Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	49
LightCycler® Nano Software	97
T _m calling	53
自動定量 (Automatic Quantification)	32, 44
シャットダウン LightCycler® Nano Instrument	97
SNP	7
SYBR	7

T

Targets タブ	
エンドポイントジェノタイピング	93
Temp. Shift Settings タブ	
high resolution melting	79
Temperature shift	79
Thresholds タブ	
エンドポイントジェノタイピング	94
T _m	7
T _m as Plate タブ	
T _m calling	56
T _m calling	
Analysis タブ	55
Melt Curve タブ	54
Melt Peaks タブ	54
Peak Areas タブ	54
Profile タブ	38
Results as Table タブ	55
Settings タブ	53
T _m as Plate タブ	56
T _m Calling 解析	53
サンプルのセットアップ	35

U

UPL	7
-----------	---

V

VIC	7
-----------	---

エ

遠心	17, 36, 58, 70, 86
エンドポイントジェノタイピング	85, 93
Analysis タブ	95
Cycles タブ	94
Data タブ	92
Endpoint Graph タブ	94
PCR ミックス	85
Profile タブ	88
Results as Plate タブ	96
Results as Table タブ	96
Run Settings タブ	87
Samples タブ	89
Targets タブ	93
Thresholds タブ	94
エンドポイントジェノタイピング解析	93
サンプルのセットアップ	85
サンプルの編集	89

ターゲットの編集	90	ソ	相対定量	57
生データ	92		Analysis Results タブ	67
キ			Analysis タブ	67
起動			Data タブ	64
LightCycler® Nano Instrument	11		PCR ミックス	57
Mac OS X 上での LightCycler®			Profile タブ	60
Nano Software の起動	13		Quantifiers タブ	66
キャリブレーションの割り当て	66		Run Settings タブ	59
コ			Samples タブ	61, 66
光学系の設定			サンプルのセットアップ	57
high resolution melting	71		サンプルの編集	61
エンドポイントジェノタイピング	87		自動定量 (Automatic Quantification)	65
絶対定量	19, 37		ターゲットの編集	62
相対定量	59		生データ	64
効率 (Efficiency)	7	タ		
サ			ターゲット	
サンプルのセットアップ			high resolution melting	74
high resolution melting	69		エンドポイントジェノタイピング	90
T _m calling	35		絶対定量	25, 40
エンドポイントジェノタイピング	85		相対定量	62
絶対定量	16, 35	ト		
相対定量	57		同一ラン内の標準曲線	35
シ		ハ		
実験の保存	27, 41, 63, 75, 91		パワーオンセルフテスト	11
自動定量 (Automatic Quantification)	30, 43, 65	ヒ		
Amplification タブ	33, 45, 51, 55		標準曲線	35
Quantifiers タブ	32, 44	フ		
Settings タブ	32, 44		プロファイル	
セ			high resolution melting	72
絶対定量	16, 35		T _m calling	38
Analysis タブ	33, 45, 51		エンドポイントジェノタイピング	88
Cq Values as Plate タブ	34, 47, 52		絶対定量	20, 38
Data タブ	29, 42		相対定量	60
Fit Point 定量 (Fit point Quantification)	48			
PCR のダイナミックレンジ	16			
PCR ミックス	16, 35			
Profile タブ	20, 38			
Results as Table タブ	33, 46, 51			
Run Settings タブ	19, 37			
Samples タブ	23, 39			
サンプルのセットアップ	16, 35			
サンプルの編集	23, 39			
自動定量 (Automatic Quantification)	30, 43			
ターゲットの編集	25, 40			
同一ラン内の標準曲線	35			
生 data	29, 42			
プロファイルの作成	20			
セルフテスト	11			

D

Published by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
Germany

© 2011 Roche Diagnostics.
All rights reserved.

www.roche-applied-science.com

① 0611